



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 863**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/08** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)  
**A61K 39/39** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01996550 .8**  
86 Fecha de presentación : **20.11.2001**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1337553**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2003**

54 Título: **Vacuna de ácido nucléico que comprende una proteína de fusión que incluye una secuencia de adyuvantes de una proteína de revestimiento vírico de plantas.**

30 Prioridad: **20.11.2000 GB 0028319**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2007**

73 Titular/es: **Cancer Research Technology Limited  
Sardinia House, Sardinia Street  
London WC2A 3NL, GB**

72 Inventor/es: **Savelyeva, Natalia y  
Stevenson, Freda**

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 267 863 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

Vacuna de ácido nucleico que comprende una proteína de fusión que incluye una secuencia de adyuvantes de una proteína de revestimiento vírico de plantas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para inducir una reacción inmunológica en una persona y a nuevas composiciones para llevar a cabo el procedimiento de la invención y procedimientos para preparar dichas composiciones. En particular, aunque no exclusivamente, la presente invención se refiere a proteínas de revestimiento vírico de plantas como secuencias adyuvantes para inducir una reacción inmunológica.

10 **Antecedentes de la invención**

15 Los determinantes idiotípicos expresados en la inmunoglobulina de superficie celular (Ig) de linfomas de células B pueden actuar como antígenos asociados a un tumor (para revisión véase George y Stevenson, 1989). Como tal, presentan un objetivo atractivo para la terapia, notablemente para la administración de un anticuerpo anti-idiotípico pasivo a pacientes (Miller y otros., 1982 *New Engl. J. Med.* 306, 517-522). Los anticuerpos monoclonales (MAbs) de murina elevados contra determinantes idiotípicos en linfomas no Hodgkin (NHLs) de células B han aportado un beneficio limitado en ensayos terapéuticos en humanos. Se han observado respuestas parciales y totales, pero los MAbs de murina tienden a reclutar las funciones efectoras humanas de manera ineficaz y son el objetivo de una respuesta de anticuerpos anti-ratón en humanos. También, se ha observado después de la terapia el crecimiento de células de linfoma negativo de Ig de superficie (Levy y otros., J. 1987 *Immunol. Rev.* 96, 43-; Bahler y Levy, 1992 *PNAS* 89, 6770-6774), aunque la pérdida completa de expresión de inmunoglobulina es rara (Meeker, y otros., 1985 *New Engl. J. Med.* 312, 1658-1665; Zelentz y otros., 1990 *Ann. Oncol.* 2, 115-122). A la luz de estas limitaciones, junto con el coste y la inconveniencia de generar MAbs para pacientes individuales, la propuesta no se ha adoptado de manera extensa. Sin embargo, está claro que los anticuerpos anti-idiotípicos tienen un potencial terapéutico en linfomas.

20 Un alternativa a la seroterapia anti-idiotípica pasiva es la inmunización activa que apunta a romper la tolerancia e inducir una fuerte respuesta de anticuerpos anti-idiotípicos en el paciente. Como que la respuesta será policlonal, es más difícil que la célula B objetivo escape de la selección, y además, la respuesta estará presente de modo ininterrumpido, y así podría controlar una enfermedad residual. Una ventaja adicional de esta propuesta es que también tiene el potencial de estimular reacciones inmunológicas mediadas por células T contra el linfoma. Los esfuerzos para estimular la inmunidad del tumor utilizando vacunas de células tumorales modificadas ha tenido un éxito limitado, pero la inmunización activa con Ig idiotípica antes de la agresión del tumor se ha mostrado eficaz en la supresión de los tumores de células B modelo (Stevenson y Gordon, 1983 *J. Immunol.* 130, 970-973; George y otros., 1987 *J. Immunol.* 138, 628-634; Campbell y otros, 1987 *J. Immunol.* 139, 2825-2833) en animales y para tratar animales que tienen un tumor incipiente (George y otros., 1988 *J. Immunol.* 141, 2168-2174). Además, la inmunización idiotípica con Ig humana aislada de pacientes con linfoma se ha asociado a una regresión continua del tumor (Kwak y otros, 1992 *New Engl. J. Med.* 327, 1209-1215).

25 El problema es cómo presentar mejor el antígeno (el anticuerpo idiotípico) para romper la tolerancia y estimular una reacción inmunológica del anti-linfoma efectiva, y esto sigue siendo un problema. Además, para los linfomas, que segregan poca inmunoglobulina, la producción del idiotipo es un problema importante. Para producir anticuerpo idiotípico suficiente para la inmunización deben prepararse heterohibridomas por fusión con líneas de células de ratón y después purificar el anticuerpo (Carroll y otros, 1985 *J. Immunol. Methods* 89, 61-67). La producción es con frecuencia baja y debe confirmarse posteriormente que la fusión derive de tumor de células B humanas.

30 Este último problema ahora se ha superado: el uso de la tecnología de ADN recombinante permite identificar fácilmente los genes de  $V_H$  y de  $V_L$  que codifican el determinante idiotípico en el material de la biopsia del paciente PCR y secuenciarlos (Hawkins y otros, 1994 *Blood* 83:3279). Estos genes se pueden ensamblar como scFv para utilizarlos como vacuna de ADN. Esta propuesta se basa en los datos que provienen de una serie de enfermedades infecciosas en las que está claro que las secuencias de codificación de ADN de patógenos pueden transfectar células directamente e inducir reacciones inmunológicas protectoras (Ulmer y otros, 1993:1745; Davis & Whalen 1995, en *Molecular and Cell Biology of Human Gene Therapeutics*. Ed. George Dickson. Chapman & HALL, p368).

35 En un trabajo anterior, en un modelo de ratón para el linfoma, se clonaron los genes V del tumor idiotoipo y se expresaron como proteínas fusión de cadena ligera y pesada en bacterias. Las cadenas separadas se utilizaron entonces como inmunógenos. Sin embargo, las cadenas separadas fueron desnaturalizadas, y en todo caso co-expresaron para proporcionar el paratopo del anticuerpo. Los autores sugirieron de hecho que "un futuro trabajo sobre péptidos con configuraciones fijas similares a los epitopos presentes en la proteína nativa pueden resultar útiles como lo puede ser la co-expresión de los genes  $V_H$  y  $V_L$  en bacterias para producir una proteína  $F_v$  recombinante" (Campbell y otros., 1987, citado anteriormente). Sin embargo, los autores no indicaron cómo aislar los genes V del idiotoipo. Tampoco los autores indicaron cómo combinar los fragmentos  $F_v$  recombinante en una vacuna.

40 Los presentes inventores han demostrado previamente que pueden prepararse construcciones de ácido nucleico que puede suministrarse a células vivas *in vivo* y que pueden entonces inducir una reacción inmunológica a un determinante idiotípico presente en una célula B maligna. La construcción codifica una proteína de fusión que comprende el

determinante idiotípico y el fragmento toxoide tetánico C (FrC). En efecto, los inventores ya han demostrado específicamente que la fusión genética de un linfoma o un antígeno asociado al mieloma a la secuencia adyuvante FrC de la toxina tetánica induce una inmunidad protectora en ratones contra la agresión con un linfoma o un mieloma cuando se utiliza como vacuna de ADN.

Sin embargo, la población humana es inmune a FrC debido a la vacunación con el toxoide tetánico. Por lo tanto, si se utiliza la vacuna a base de FrC en pacientes funcionará en una configuración de inmunidad preexistente al FrC. Hasta ahora los inventores han encontrado que el anticuerpo preexistente no reduce la respuesta a la vacuna de ADN. Sin embargo, es posible que se activen distintas vías inmunológicas en esta situación.

### Descripción resumida de la invención

Dado lo anterior, los presentes inventores han apreciado que existe la necesidad de proporcionar nuevas secuencias de adyuvantes que venzan los potenciales problemas relacionados con la inmunidad preexistente al fragmento C del toxoide tetánico.

Las proteínas de revestimiento vírico de plantas son moléculas altamente inmunogenéticas cuando se inyectan a mamíferos. Se han utilizado como vacunas de proteínas cuando se ensamblan en partículas virales para presentar epitopos de agentes infecciosos (Brennan, F.R. y otros. *Vaccine* 17, 1846-1857 (1999)). Tales vacunas pueden inducir altos niveles de anticuerpos neutralizantes y en algunos casos una protección contra agresión con patógeno (Haynes, J.R. y otros *Bio/Technology* 4, 637-641 (1986); Turpen, T.H. y otros *Bio/Technology* 13, 53-57 (1995)). El virus de la patata X (PVX) se utilizó para suministrar sistémicamente un fragmento de anticuerpo de cadena única funcional como una fusión a la proteína de revestimiento de PVX en plantas (Smolenska, L. y otros *FEBS letters* 441, 379-382 (1998)). Sin embargo, las fusiones a base de proteínas de revestimiento de PVX nunca se suministraron como ADN en células de mamíferos. Para un suministro de ADN, se ha utilizado la proteína de revestimiento del virus del mosaico del tabaco para producir el anticuerpo contra él mismo (Hinrichs, J. y otros, *Journal of Virological Methods* 66, 195-202 (1997)) pero no se ha utilizado como parte de una fusión para inducir de este modo una reacción inmunológica contra el (los) otros miembro(s) de la construcción de fusión.

Los inventores han encontrado que la proteína de revestimiento del virus X de la patata (PVXCP) funciona sorprendentemente bien como coadyuvante en la construcción de una vacuna de ADN para inducir una inmunidad protectora. En particular, los inventores han fusionado genéticamente PVXCP a un antígeno asociado al linfoma (scFv-A31) y han utilizado la construcción para la vacunación de ADN de ratones. Esto dio lugar a elevadas respuestas de anticuerpos y a protección contra la agresión con linfoma A31 (véase ejemplo 4, figura 14A). Los inventores han demostrado además que esta protección fue mediada por anticuerpo a scFv-A31 y células positivas CD4. Esto se diferencia de la vacunación de ADN utilizando la fusión de FrC a ScFv-A31, en la que tal protección está mediada solamente por el anticuerpo al scFv. Estas conclusiones podrían ser significativas si se considera la enfermedad a tratar, por ejemplo cuando la eficacia del tratamiento depende de una respuesta celular en contraposición a una respuesta de anticuerpo.

Los inventores también han fusionado un antígeno específico de mieloma scFv-5T33 a PVXCP. Esta construcción se utilizó después para vacunar ratones. Esta vacunación dio lugar a una inducción de respuestas de anticuerpo contra scFv-5T33 y una protección contra agresión con mieloma 5T33 (véase ejemplo 4, figura 14B). Los inventores también determinaron que en este ejemplo la protección contra mieloma está mediada por células T positivas CD4.

De este modo, los inventores han mostrado asombrosamente que la proteína de revestimiento vírico de plantas, por ejemplo PVXCP puede actuar como adyuvante para la inducción de inmunidad protectora contra células tumorales, por ejemplo, linfoma y mieloma.

En un primer aspecto, la presente invención dispone una construcción de ácido nucléico para el suministro a las células vivas *in vivo* para inducir una reacción inmunológica en un paciente a un antígeno; dirigiendo la construcción la expresión de una proteína de fusión, comprendiendo dicha proteína de fusión el citado antígeno y un adyuvante, en el que dicho adyuvante es PVXCP.

En una realización, el antígeno de la invención deriva de un patógeno, tal como un virus (por ejemplo, el virus herpes simple, virus de inmunodeficiencia humana, etc.) o una bacteria (por ejemplo, estafilococo, salmonella, etc.). Sin embargo, los inventores han encontrado que la presente invención es particularmente aplicable si el antígeno es un autopolipéptido o un autopolipéptido alterado o deriva de un autopolipéptido o un autopolipéptido alterado. El autopolipéptido o autopolipéptido alterado puede estar asociado a una enfermedad autoinmune o un tipo de cáncer. Con respecto al cáncer, el autopolipéptido o autopolipéptido alterado es un antígeno asociado al tumor tal como un determinante idiotípico de una afección del linfocito.

De este modo, en una realización preferida, la invención dispone una construcción de ácido nucléico para el suministro a células vivas *in vivo* para inducir una reacción inmunológica en un paciente a un autopolipéptido o autopolipéptido alterado, dirigiendo la construcción la expresión de una proteína de fusión, comprendiendo dicha proteína de fusión el autopolipéptido o autopolipéptido alterado y un adyuvante, en el que dicho adyuvante es PVXCP.

Preferiblemente, el adyuvante favorece una respuesta de células T coadyudantes cuando se administra a un paciente. Más preferiblemente, el adyuvante comprende por lo menos un epitopo de célula T coadyuvante.

## ES 2 267 863 T3

Preferiblemente, la proteína de fusión comprenderá una pluralidad de epitopos PVXCP, tanto célula B como T. Típicamente el PVXCP se dispondrá en el lado carboxilo del antígeno.

5 Será evidente para los expertos en la materia que la composición, las vacunas de ácido nucleico (ADN) y los procedimientos de la presente invención se pueden utilizar para producir o suprimir la reacción inmunológica a un antígeno particular. Si el antígeno es un antígeno asociado a un tumor entonces será claramente deseable provocar la reacción inmunológica al antígeno para así detener o reducir el crecimiento del tumor. La mejora de la reacción inmunológica es un aspecto preferido de la presente invención y preferiblemente la mejora es respecto a antígenos asociados a un tumor en general, pero particularmente determinantes idiotípicos en la inmunoglobulina expresada en la superficie de afecciones de células B, determinantes idiotípicos de receptores de células T (TCRs) expresados en la superficie de afecciones de células T, oncogenes mutados u otros autopolipéptidos expresados en la superficie de tumores, y antígenos oncofetales.

15 Por conveniencia, la siguiente descripción explicará la invención en relación con determinantes idiotípicos. Sin embargo, será evidente para el experto que la invención puede aplicarse con facilidad a cualquier antígeno, por ejemplo, un antígeno derivado de patógenos tales como virus o bacterias, autopolipéptidos o autopolipéptidos alterados y, en particular, antígenos asociados a un tumor.

20 El determinante idiotípico está presente preferiblemente en la proteína de fusión esencialmente en la misma configuración que la que adopta en la superficie de las células B malignas del paciente, optimizando así la eficacia de la reacción inmunológica anti-idiotípica inducida por la construcción. Esto se consigue convenientemente por la expresión del determinante idiotípico dentro del contexto de una parte de una molécula de inmunoglobulina (Ig) o de una molécula de tipo inmunoglobulina, tal como un fragmento de cadena única Fv (scFv). El fragmento de scFv es particularmente conveniente, proporcionando las características estructurales del determinante idiotípico necesarias con pocos residuos de aminoácidos. Sin embargo, si se desea, pueden incluirse residuos de aminoácidos adicionales en la proteína de fusión, tal como uno o más dominios constantes (por ejemplo Syrengelas y otros, 1996 Nature Medicine 2, 1038). Así, por ejemplo, el determinante idiotípico se podría expresar en el contexto de una molécula entera de inmunoglobulina.

30 En una realización preferida, la proteína de fusión se expresa con una secuencia líder (reconocida en células humanas) que dirige la proteína de fusión al retículo endoplasmático, donde la secuencia líder se separa de la proteína de fusión. Se conoce una gran cantidad de secuencias líder apropiadas que incluyen, por ejemplo, las secuencias líder (tales como las que son para V<sub>H</sub>1 que se describe a continuación) que se encuentran en el extremo 5' de genes V humanos. Los presentes inventores han encontrado que dichas secuencias líder mejoran la inmunogeneticidad de la proteína de fusión. En principio, es posible que cualquier otra secuencia líder ejerza un efecto ventajoso equivalente, pero es probable que los que son más similares a la secuencia líder de tipo inmunoglobulina natural sea óptimos.

40 Por motivos de conveniencia, la construcción de ácido nucleico comprende preferiblemente un número de sitios de reconocimiento del endonucleasa de restricción. En particular, unos o más de dichos sitios de reconocimiento se pueden localizar 5' de la secuencia que codifica el determinante idiotípico (convenientemente entre la secuencia líder opcional y la secuencia que codifica el determinante idiotípico), y se pueden localizar unos o más sitios 3' de la secuencia que codifica el determinante idiotípico (convenientemente entre la secuencia que codifica el determinante idiotípico y el (los) epitopos de la PVXCP). De esta manera, puede adaptarse fácilmente la misma construcción básica para expresar diferentes proteínas de fusión en las que el determinante idiotípico puede alterarse. De este modo pueden introducirse con facilidad en la construcción secuencias que codifican determinantes idiotípicos de distintos pacientes.

50 En una realización particular, la presente invención dispone un ácido nucleico de vacuna que se puede utilizar para provocar una reacción inmunológica contra linfocitos humanos transformados mostrando un marcador idiotípico, codificando el ácido nucleico proteínas que comprenden zonas variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo anti-idiotípico mostrado en la superficie de una célula B humana maligna y PVXCP.

55 En un segundo aspecto, la invención dispone un procedimiento para preparar una construcción de ácido nucleico para producir una reacción inmunológica contra un antígeno, comprendiendo el procedimiento:

- (a) identificar una secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno;
- (b) clonar la secuencia del ácido nucleico; e
- (c) introducir el ácido nucleico clonado en un vector, permitiendo dicho vector que la proteína sea expresada como una fusión con un adyuvante, en el que dicho adyuvante es PVXCP.

65 El antígeno puede derivarse de un patógeno, tal como un virus o una bacteria. Sin embargo, en una realización preferida de la invención, el antígeno es un autopolipéptido o un autopolipéptido alterado, por ejemplo un antígeno asociado a un tumor.

## ES 2 267 863 T3

En otro aspecto, la invención dispone un procedimiento para preparar una construcción de ácido nucleico para tratar a un paciente que padece una afección de células B, comprendiendo el procedimiento:

- 5 (a) identificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un determinante idiotípico presente en las células B malignas del paciente mediante análisis de una muestra de células del paciente;
- (b) clonar la secuencia del ácido nucleico que codifica el determinante idiotípico; e
- 10 (c) introducir el ácido nucleico reproducido en un vector, permitiendo dicho vector que el determinante idiotípico sea expresado como una fusión con un adyuvante, en el que dicho adyuvante es PVXCP.

Preferiblemente, el adyuvante puede favorecer respuestas de células T coadyudantes *in vivo*. Más preferiblemente, el adyuvante comprende por lo menos un epítipo de célula T coadyudante.

15 Convenientemente, el ácido nucleico que codifica el determinante idiotípico se clona de una muestra de células del paciente por PCR. Hay disponible ahora una gran familia de iniciadores de PCR genéricos apropiados, capaces de recuperar secuencias de ácidos nucleicos que codifican esencialmente cualquier determinante idiotípico de células B (Hawkins & Winter, 1992 Eur. J. Immunol. 22, 876). Típicamente, la afección de las células B es un linfoma o un mieloma. Generalmente, la construcción de ácido nucleico producida por el procedimiento definido anteriormente  
20 estará de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

Un procedimiento para inducir una reacción inmunológica en un paciente puede comprender la etapa de administrar al citado paciente una construcción de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto de la invención definido  
25 anteriormente. Preferiblemente, la construcción de ácido nucleico forma parte de un vector de expresión del ácido nucleico tal que el adyuvante y el antígeno pueden expresarse en el paciente. La secuencia del ácido nucleico se puede expresar en el paciente sin entrar en el genoma del paciente.

Preferiblemente, la construcción de ácido nucleico de la invención forma una vacuna de ADN desnudo. Dicha  
30 vacuna de ADN se utiliza para inducir una reacción inmunológica contra el producto de la proteína codificado por el ADN.

La vacuna de ADN se ha utilizado con éxito en el pasado como manera de inducir una reacción inmunológica, véase por ejemplo King y otros, Nature Medicine 4: 13B1, 1998.

35 Un procedimiento para vacunar un paciente contra una enfermedad infecciosa puede comprender administrar al paciente una construcción de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en un medio fisiológicamente aceptable, en el que el antígeno se deriva de un patógeno asociado a dicha enfermedad. El procedimiento se puede realizar en un paciente con dicha enfermedad infecciosa o en sujeto en peligro de contraer la enfermedad  
40 infecciosa.

Un procedimiento para tratar un paciente que padece cáncer o tiene riesgo de padecerlo puede comprender la etapa de administrar al citado paciente una construcción de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto de la  
45 invención, en un medio fisiológicamente aceptable, en el que el antígeno es un antígeno asociado a un tumor asociado a dicho cáncer. El antígeno asociado al tumor puede haberse derivado bien de las propias células cancerosas de los pacientes.

Un procedimiento para tratar un paciente que padece una afección de células B y/o un procedimiento para inducir una reacción inmunológica en un paciente contra un antígeno asociado a un tumor puede comprender administrar al  
50 paciente una construcción de ácido nucleico de acuerdo con el primer aspecto de la invención definido anteriormente, para inducir una reacción inmunológica al determinante idiotípico presente en la superficie de las células B malignas del paciente. Los linfomas o mielomas de las células B son las afecciones que preferiblemente trata el procedimiento de la invención.

Preferiblemente, la secuencia del ácido nucleico que codifica el determinante idiotípico se clona a partir de mues-  
55 tras obtenidas del individuo a quien se suministra. La secuencia del ácido nucleico se suministra convenientemente en forma sin cápsida (es decir, no incluida en una partícula vírica u otro paquete). Sin embargo, el ácido nucleico puede asociarse a la superficie externa de un paquete o una partícula (por ejemplo un liposoma o una partícula viral), lo cual permite la posibilidad de un suministro mediado por el receptor del ácido nucleico.

60 La proteína de fusión puede dirigir la expresión del determinante idiotípico y el PVXCP solo. Alternativamente, la proteína de fusión puede comprender, además, otras secuencias del polipéptidos inmunomoduladores, tales como otras proteínas inmunogenéticas extrañas, o citoquinas. En efecto, puede ser valioso utilizar varias parejas de fusión antigénicas para ayudar a prevenir el problema teórico de que la reacción inmunológica al grupo altamente inmu-  
65 nogenético de la proteína de fusión pueda derrotar en última instancia cualquier respuesta al determinante idiotípico inmunogenético de una manera relativamente débil. Otras proteínas de revestimiento de virus inmersos y superficie celular inmunogenética o proteínas segregadas derivadas de cualquier organismo patógeno o especie no humana pueden ser apropiadas para la inclusión en la proteína de fusión.

Una modificación alternativa es diseñar la construcción de ácido nucleico para tener en cuenta la coexpresión de los polipéptidos inmunomoduladores adicionales como entidades separadas en lugar de fusiones con el determinante idio-  
típico/epitopo de proteína de revestimiento viral de plantas. Menos preferiblemente, el procedimiento de la invención  
podría emplear el uso de una construcción de ácido nucleico separada para expresar los polipéptidos inmunomodula-  
dores adicionales.

Se conoce un número de citoquinas para mejorar aspectos de la presentación del antígeno y el suministro directo  
de vectores de la expresión que contienen genes de citoquinas podría mejorar la eficacia de la vacuna. El interfe-  
rón gamma es un ejemplo que podría ser útil debido a la propiedad de inducir la expresión de la CMH (Gaczyns-  
ka y otros 1993 Nature 365, 2, 264-267). Otro polipéptido que podría expresarse mediante el ácido nucleico de la  
vacuna es el factor estimulador de colonia de macrófago granulocito (GM-CSF). El gen relevante podría ser codi-  
ficado en un mismo vector, o en uno separado, y la cantidad de polipéptido expresado varía de manera indepen-  
diente.

Una ventaja del enfoque genético a la vacunación es que permite potencialmente un uso eficaz del procedimiento  
natural de presentar el antígeno, que debe por lo tanto acoplarse a una amplia gama de sistemas efectores. Además,  
la manipulación y la mejora de la respuesta obtenida deben ser relativamente fáciles; por ejemplo, puede ser posible  
mejorar la eficacia de la presentación del antígeno a las células T expresando moléculas con actividad coestimuladora  
junto con el inmunógeno. Una molécula importante implicada en el coestímulo es B7, que interactúa con CD28  
expresado por células T proporcionando así señales accesorias para la activación de la célula T (Galvin y otros, 1992  
J. Immunol. 12, 3802-3808). Podrían construirse vectores que expresen B7 y la Ig idiotípica. Las secuencias tanto de  
ratón como de humanos B7 están publicadas (Freeman y otros, 1989 J. Immunol. 8, 2714-2722) y los genes se pueden  
clonar fácilmente por PCR.

Los procedimientos terapéuticos descritos también pueden comprender el suministro de una segunda secuencia  
de ácido nucleico al individuo, dirigiendo la segunda secuencia de ácido nucleico la expresión de otro polipéptido  
inmunomodulador con el fin de modular adicionalmente la reacción inmunológica al determinante idiotípico. Esta  
segunda secuencia de ácido nucleico puede estar comprendida en la misma molécula del ácido nucleico que la primera  
secuencia de ácido nucleico, o puede estar presente en una segunda molécula del ácido nucleico.

Los procedimientos para introducir la construcción de ácido nucleico en células vivas *in vivo* son bien conoci-  
dos ahora para los expertos en la materia. Convenientemente, el ácido nucleico se inyecta simplemente como ADN  
desnudo en el paciente (típicamente por vía intramuscular) como mezcla con un diluyente fisiológicamente acepta-  
ble, tal como una solución salina. Los detalles de algunos procedimientos convenientes y realizaciones preferidas de  
administración de la construcción de ácido nucleico en un paciente se describen en las patentes americanas números  
5.580.859 y 5.589.466. Más procedimientos de transferencia de genes implicados incluyen el uso de vectores virales,  
encapsulamiento de ADN en liposomas, acoplamiento de ADN a liposomas catiónicos o al exterior de virus (para una  
revisión véase Miller, 1992 Nature 357, 45-46). Éstos tienen la ventaja de una mayor eficacia de transferencia pero,  
en comparación con la inyección directa de ADN plásmido purificado, estas propuestas alternativas están en cierta  
medida implicadas y dan lugar a más problemas de seguridad.

En otro aspecto, la invención dispone por lo tanto una composición para el uso en el procedimiento para tratar un  
paciente que padece una afección de células B o un procedimiento para inducir una reacción inmunológica contra un  
antígeno asociado a un tumor en un paciente, comprendiendo la composición una construcción de ácido nucleico que  
dirige la expresión de una proteína de fusión, comprendiendo dicha proteína de fusión un determinante idiotípico o un  
antígeno asociado al tumor que se encuentra presente en las células B malignas del paciente y PVXCP, junto con un  
diluyente o portador fisiológicamente aceptable.

En una realización particular, la presente invención supone el aislamiento de los genes V de las células B del tumor  
para expresar el idiotopo (y paratopo) del anticuerpo del tumor. De este modo, partiendo de una muestra de células  
B del paciente, los genes V reorganizados tanto de cadena pesada como ligera se amplifican utilizando la reacción en  
cadena de la polimerasa e iniciadores "universales" genéricos (Orlandi y otros., 1989 PNAS 86, 3833-3837; Marks  
y otros, 1991 J. Mol. Biol. 222, 581-597; véase también la tabla 1, id. de sec. n<sup>os</sup> 1-48). Los genes V amplificados  
son clonados y después secuenciados (Sanger y otros., 1977 PNAS 74., 5463-5467). Los de las células B malignas  
se identifican como secuencias de genes V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> repetidas predominantes. En varios pacientes, y tanto para cadenas  
pesadas como ligeras, fue posible identificar una secuencia repetida común. La combinación de las cadenas pesadas y  
ligeras identifica el idiotopo del tumor (Ejemplo 1). En principio, también sería posible amplificar y enlazar los genes  
V reorganizados dentro de la misma célula (Embleton y otros., Nucl 1992. Acids Res. 20, 3831-3837) para identificar  
una mayor combinación de secuencias de cadena pesada y ligera enlazadas que identifiquen el idiotopo pero aquí el  
V<sub>H</sub> y el V<sub>L</sub> se identifican por separado y después son enlazados por el ensamble PCR. Los genes V<sub>H</sub> y el V<sub>L</sub> se clonan  
en vectores para la expresión de ambos dominios V como fragmento del anticuerpo funcional, por ejemplo como  
fragmento Fv de cadena única enlazado (véase a continuación).

Idealmente, una vacuna debe ser capaz de estimular células B específicas del antígeno, linfocitos T citotóxicos  
(CTLs) y células T coadyudantes. El estímulo de las células B requiere que el antígeno objetivo se enlace con una  
afinidad suficientemente alta a receptores de antígenos específicos (Ig de superficie) en la superficie de la célula B.  
Ciertos antígenos multivalentes pueden estimular la proliferación de células B directamente pero más a menudo, y  
para proporcionar una respuesta anamnésica eficaz, existe un requerimiento para señales adicionales proporcionado

por las células T coadyudantes (véase a continuación). En la presente invención, la ayuda de las células T es reclutada expresando el determinante idiotípico como una proteína de fusión con PVXCP.

Los receptores de células T (TCRs) de CTLs reconocen péptidos asociados a CMH específicas de clase I mostradas en la superficie de la célula objetivo. Dichos péptidos se derivan generalmente mediante el procesamiento de polipéptidos o proteínas más grandes fabricados dentro de la célula objetivo. De este modo, para una estimulación eficaz de CTL el antígeno objetivo debe sintetizarse de manera intracelular en células que expresen CMH clase I. El nivel de expresión debe ser bastante elevado para generar el suficiente péptido para desplazar aquellos autopéptidos que se encuentran normalmente unidos (posiblemente con una afinidad más elevada) en la ranura de enlace del péptido CMH (Ohno, 1992 PNAS 89, 4643-4647). Al igual que las células B específicas de antígeno, para la proliferación y una mayor capacidad citotóxica, los CTLs requieren señales adicionales (en forma de citoquinas) tras el reconocimiento de los antígenos y éstos son proporcionados por las células T coadyudantes.

Las células T coadyudantes CD4 positivas interactúan (a través de sus TCRs únicos) con péptidos asociados a CMH de clase II específicas de la superficie de las células y dichos péptidos son derivados generalmente por división de antígenos de proteínas solapados entre sí por células que presentan antígenos especializados (APCs). Los macrófagos, células dendríticas y linfocitos B se encuentran entre las células que pueden presentar el antígeno de esta manera. De este modo, los linfocitos B asimilan y procesan el antígeno unido a su Ig superficial y posteriormente presentan péptidos derivados asociados a CMH de clase II. Las células coadyudantes T CD4-positivas que reconocen el péptido superficial pueden entonces liberar varias citoquinas inmunoestimuladoras y estimular más la activación y la proliferación de células B y la producción de anticuerpos. De manera similar, los macrófagos presentes en el sitio de una respuesta inflamatoria local pueden procesar un antígeno fagocitado y estimular la liberación de citoquina mediante células T coadyudantes, dando lugar a una activación, proliferación y citotoxicidad mejoradas de CTLs residentes localmente.

Por lo tanto, el antígeno de la vacuna debe idealmente (1) sintetizarse intracelularmente por células huésped positivas de CMH de clase I, (2) dar lugar a péptidos que, cuando sean mostrados por células huésped de CMH de clase I puedan estimular un subconjunto del CTLs anfitriones a través de sus TCRs, (3) dar lugar a péptidos que, cuando sean mostrados por células huésped de CMH de clase II puedan estimular un subconjunto de células T coadyudantes anfitriones a través de su TCRs, (4) asimilarse y procesarse mediante APCs anfitriones incluyendo tanto macrófagos como células B específicas de antígenos, (5) estar disponible en su forma nativa para la interacción con linfocitos B anfitriones.

En otra realización específica, la invención prevé la expresión de los genes  $V_H$  y  $V_L$  reorganizados del idiotopo del anticuerpo del tumor dentro de células de mamíferos, permitiendo la producción de péptidos para la representación en la superficie de la célula conjuntamente con la CMH anfitriona, y para la representación (o la secreción) del paratopo (como fragmento de anticuerpo doblado), para provocar la producción de anticuerpos anti-idiotípicos. Los fragmentos de anticuerpos se podían introducir en células de mamíferos por infección con un virus recombinante que codifique los fragmentos del anticuerpo.

En principio, los fragmentos del anticuerpo podrían ir provistos de una secuencia de señal para su secreción o representación en la superficie (transfectada) de la célula infectada. Alternativamente, los fragmentos se podrían unir a otra proteína que se muestre en la superficie de la célula, por ejemplo una proteína de revestimiento viral, según lo descrito en el Ejemplo 2. Los fragmentos del anticuerpo (como fragmentos Fv de cadena única) se representan en forma funcional unidos a la proteína de revestimiento de un virus, indicando que también están doblados y en una forma nativa en la superficie de una célula infectada (Russell y otros., 1993 Nucl. Acids Res. 21, 1081-1085).

Los fragmentos del anticuerpo también podrían introducirse en células de mamíferos utilizando ácido nucleico que codifique fragmentos del anticuerpo. Por ejemplo, puede utilizarse un gen que codifique una proteína de fusión entre PVXCP y los fragmentos del anticuerpo para inmunizar ratones mediante inyección directa (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular).

Se ilustrarán ahora aspectos y realizaciones de la presente invención, a modo de ejemplo, con referencia a las figuras que se acompañan. Para los expertos en la materia serán evidentes otros aspectos y realizaciones. Todos los documentos mencionados en este texto se incorporan aquí por referencia.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación esquemática del procedimiento de ensamblaje de PCR de ADN que expresa scFv;

La figura 2 muestra la secuencia de vectores utilizados para expresar y purificar inmunoglobulina idiotípica scFv;

La figura 3 es una representación esquemática del procedimiento utilizado para producir plásmido pNipenv;

La figura 4 es una representación esquemática de las construcciones de plásmido pNipenv, Nipenv pSV2, Bip stop env pSV2, y pSV2 BCL env;

La figura 5 muestra la secuencia de un fragmento *HindIII*-*XbaI* del vector pVAC1;

## ES 2 267 863 T3

La figura 6 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento de inmunización descrito en el ejemplo 3;

La figura 7 muestra la secuencia entera del vector pVAC1;

5 La figura 8 muestra un mapa de restricción pVAC1;

La figura 9 muestra una representación esquemática de las principales características del pVAC1;

La figura 10 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento de inmunización descrito en el ejemplo 3;

10

Las figuras 11a y 11b muestran los resultados del análisis FACS descrito en el ejemplo 2;

La figura 12 ilustra el ensamblaje de las fusiones scFv-PVXCP.

15

Las figuras 13A-D muestran gráficos que ilustran los niveles de anticuerpos producidos en un experimento descrito en el ejemplo 4.

Las figuras 14A y B muestran gráficos que ilustran la protección contra agresión con linfoma A31 o el mieloma 5T33 después de la vacuna de ADN.

20

La figura 15 muestra un gráfico que ilustra la protección contra agresión con mieloma 5T33 tras la vacuna con secuencias de ADN fusionadas y separadas.

Las figuras 16A y B muestran gráficos que ilustran la protección contra agresión con linfoma A31 en ratones tratados o no tratados con anticuerpos monoclonales anti-CD4+ tras la vacunación.

25

La figura 17 muestra un gráfico que ilustra la protección contra agresión con el mieloma 5T33 en ratones tratados o no tratados con anticuerpos monoclonales anti-CD4+ después de la vacunación.

30

Las figuras 18A y B muestran los resultados del análisis de las proteínas scFv5T33-PVXCP y PVXCP en experimentos descritos en el ejemplo 4. (En B, bar=200 nM.)

La figura 19 muestra los resultados de un experimento descrito en el ejemplo 5. El gráfico muestra la protección después de la vacunación con p.scFvBCL1-PVXCP (3x vacunados y después agresión con  $5 \times 10^4$  células BCL1).

35

### **Descripción detallada de la invención**

#### **Ejemplos**

40

Ejemplo 1

#### *Identificación de genes V de biopsias del linfoma de células B*

##### *Preparación del material de biopsia*

45

Los especímenes de la biopsia se obtuvieron a partir de cinco pacientes con un linfoma folicular confirmado patológicamente. Se obtuvieron durante procedimientos de diagnóstico rutinarios. Las cadenas ligeras fueron identificadas como kappa o lambda mediante inmunohistoquímica. Como controles no malignos se obtuvo un nódulo linfático del intestino delgado de un paciente con enfermedad de Crohn y una muestra del bazo de un paciente que padecía esplenectomía. El material de biopsia se preparó como una suspensión unicelular y las células se congelaron y se almacenaron posteriormente a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

50

##### *Preparación de ADN para PCR*

55

Para la PCR se preparó el ADN utilizando un método de lisis proteínasa K/Tween 20 simple (Innis y otros., 1990 PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications; Academic Press Inc., pl47). Brevemente, las células se pusieron en forma de píldora por centrifugación durante 20 segundos a 13.000 rpm en una microcentrifugadora. Las células se lavaron después dos veces con 1 ml de PBS antes de volverlas a suspender de nuevo en aproximadamente  $10^6/\text{ml}$  en búfer K (10 mM Tris.Cl (pH 8,3), KCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM, Tween 20 0,5%, 100 mg/ml de proteínasa K) y se incubaron a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 60 minutos para lisar las células y liberar el ADN. Después se inactivó la proteínasa K por incubación durante 30 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ . El ADN así liberado se utilizó directamente en las reacciones PCR o se almacenó para un uso posterior a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

60

##### *Iniciadores de PCR*

65

Se diseñaron iniciadores de PCR para amplificar genes de cadena pesada kappa y cadena ligera lambda reorganizados. Los iniciadores 5' se basan en el esquema 1 de los genes V. Los iniciadores VH y de Vk son similares a los descritos por Marks y otros. (1991). Sin embargo, para la amplificación a partir de ADN genómico (a diferencia de

ADNc) se encontró que el producto era más limpio si se utilizaban iniciadores acortados por una base en el extremo 3' (datos no mostrados). Además, el número de iniciadores utilizados se redujo combinando iniciadores similares como un iniciador de consenso. Con la excepción de un cambio en los iniciadores JH, para introducir un sitio BstEII común, no se realizaron cambios para introducir sitios de restricción.

5

La información de secuencia limitada de ADN estaba disponible sobre la cual basar los iniciadores V $\lambda$  pero los iniciadores se realizaron a las familias V $\lambda$ 1, V $\lambda$ 2, V $\lambda$ 3 y V $\lambda$ 4 a partir de los datos de secuencias disponibles (Songsivilai, y otros. 1990. Eur. J. Immunol. 20, 2661-2666; Alexandre y otros, Nucl 1989. Acids Res. 17, 3975; Bernard y otros. 1990 Nucl. Acids Res. 18, 7139; Chuchana y otros, 1990 Eur J. Immunol. 20, 1317-1325). Se sabe que existen otras familias (Chuchana y otros, 1990) pero no existían datos de secuencias de nucleótidos disponibles y así no se prepararon iniciadores. Los iniciadores de zona J se hicieron que fueran complementarios a la secuencia genómica de las zonas J de la línea germinal para la cadena pesada (Ravetch y otros, 1981 Cell 27, 583-591), cadena kappa (Hieter y otros, 1982 I. Biol. Quím. 257, 1516-1522) y cadena lambda (Udey y Blomberg 1987 Immunogenetics 25, 63-70; Dariavach 1987 PNAS 84, 9074-9078; Bauer y Blomberg 1991 J. Immunol. 146, 2813-2820; Combriato y Klobeck, Eur 1991. J. Immunol. 21, 1513-1522; Fripiat, 1990 Nucl. Acids Res. 18, 7134). Los genes J $\lambda$  se combinan con sus respectivos genes C $\lambda$  y, de este modo, como que C $\lambda$ 4, C $\lambda$ 5 (Dariavach, 1987) y probablemente C $\lambda$ 6 (Bauer y Blomberg, 1991; Combriato y Klobeck, 1991) son pseudogenes, no deben aparecer como proteína expresada. En consecuencia, no se realizaron iniciadores para estos genes J $\lambda$ . Combinando dos iniciadores de la zona J, en todas las tres JI se realizaron iniciadores J $\lambda$ , J $\lambda$ 2, J $\lambda$ 2/3, J $\lambda$ 7. La Tabla da una lista completa de los iniciadores primarios de la PCR utilizados en el Ejemplo 1.

20

#### *Amplificación de PCR de zonas variables de inmunoglobulina reorganizada*

La familia del genes V y los iniciadores de la zona J se utilizaron como mezclas equimolares de los iniciadores individuales que se muestran en la Tabla 1. Las mezclas VHBACK y JHFOR se utilizaron para la reacción de la PCR de cadena pesada. Se utilizaron mezclas similares para la amplificación de la PCR de cadena kappa o lambda.

25

La amplificación de la PCR se realizó en 50  $\mu$ l de volumen utilizando un reactor terminal Hybaid (Hybaid). Las mezclas de reacción contenían 20 pmoles de cada mezcla de iniciador, dNTPs 250  $\mu$ M (Pharmacia, Uppsala, Suecia) en 1 x búfer de PCR (Promega, 10 mM Tris.Cl [pH 8,8], KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 0,1% Triton X-100). Para minimizar cualquier riesgo de contaminación se tomaron exhaustivas precauciones. Las mezclas se prepararon en una cámara de flujo laminar en una habitación diseñada específicamente para preparar reacciones PCR. Las muestras se trataron después con UV durante 5 minutos en un horno de UV (Amplirad, Genetic Research, Dunmow, Reino Unido). Se añadió entonces la plantilla (5  $\mu$ l), la mezcla de reacción se recubrió entonces con aceite mineral (sigma) y la muestra se calentó a 94°C durante 5 minutos. En esta etapa se añadió polimerasa de ADN Taq (Promega), 2,5 unidades. La amplificación se realizó utilizando 35 ciclos, 94°C 1 min, recocido 65°C, 1 min; estiramiento 72°C, 1 min.

30

35

Las zonas variables amplificadas fueron analizadas en un gel de agarosa TAE de bpf al 1,5% y se visualizaron con bromuro de etidio. La banda de tamaño 320/350 pares de bases se suprimió y se purificó utilizando un kit GENE-CLEAN II (Bio101) según las instrucciones de los fabricantes. Se llevaron a cabo por lo menos dos amplificaciones PCR independientes de zonas V a partir de la muestra de cada paciente y la PCR del ADN del nódulo linfático se realizó antes de la correspondiente PCR a partir de las heterohibridomas (que se encontraban también disponibles).

40

#### *Clonación y secuenciación de los productos de la PCR*

Se utilizó el sistema de clonación de vectores T descrito por Marchuk (Marchuk y otros, 1991 Nucl. Acids Res. 19, 1154). En síntesis, el vector se preparó de pBluescript II KS+ (Stratagene) por digestión con EcoRV (de NBL) para producir extremos romos y después el tratamiento con polimerasa de ADN Taq (Promega) en búfer de PCR (Promega) que contenía dTTP 2 mM a 70°C durante 2 horas. El producto de la PCR del gen V purificado se ligó al vector T y se transformó en *E. coli* - tipo TG1 competente (Gibson, 1984 p.H. D. thesis, University of Cambridge, Reino Unido). Los clones recombinantes se identificaron por selección azul/blanco utilizando isopropil- $\beta$ -tiogalactosidopiranosido (IPTG, sigma). Se recogieron clones recombinantes aleatorios y se preparó ADNss después de la superinfección con fago coadyudante (MI3KO7, Stratagene) (Vieira y Messing, 1987 Methods Enzymol. 153, 3-11). Los clones fueron secuenciados mediante el procedimiento dideoxi (Sanger y otros., 1977) utilizando polimerasa de ADN T7 (Sequenase, USB, Cleveland, USA). Se secuenció un número de clones de cada paciente y se compararon las secuencias.

45

50

55

#### *Ensamblaje de genes V tumorales como scFv*

El procedimiento de ensamblaje, ilustrado en la figura 1, se basa en el descrito por Davis y otros, (1991 Bio/Technology 9, 165-169). El proceso de ensamblaje utiliza un segundo grupo de iniciadores. Los iniciadores VHSfBAK codifican el sitio de clonación *Sfi*I y también hibridizan al sistema original de iniciadores VHBAK. Los iniciadores scJHFOR y scVk/V $\lambda$ BAK hibridizan a sus respectivos iniciadores iniciales pero también codifican el elemento de enlace del sc para permitir la producción de un Fv de cadena única (scFv) (Huston y otros, 1988 PNAS 85, 5879-5883).

60

65

Los iniciadores NotJk/IFOR hibridizan a sus respectivos iniciadores iniciales pero también incluyen el sitio de restricción *Not*I. Estos iniciadores también se resumen en la Tabla 1. El ensamblaje se realiza en dos etapas. Primero

se amplificaron los genes V (cadenas pesadas y ligeras) a partir de la plantilla de secuenciación utilizando el nuevo conjunto de oligonucleótidos. La mezcla de PCR se preparó tal como se ha indicado anteriormente pero los iniciadores utilizados fueron solamente los iniciadores relevantes de la familia de genes V y zona J identificados por la secuencia anterior. La plantilla era una plantilla de secuenciado de 100 ng de ADNss. Las condiciones de la PCR eran 94°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto, 74°C. para 1 minuto con 10 ciclos de amplificación. Al final de la PCR se añadieron los dNTPs adicionales (5 ml de solución tampón de 2,5 mM) con polimerasa Klenow (Boehringer; 2,5 unidades) y entonces se incubó a 20°C durante 15 minutos para producir extremos romos.

Después de esta etapa el producto fue purificado en gel tal como se ha indicado anteriormente y fue suspendido de nuevo en 25 ml de agua. Después se utilizó en el ensamblaje 5 ml del producto de cadena pesada y 5 ml del producto de cadena ligera. Para este proceso la reacción PCR se realizó en dos etapas. Inicialmente no se añadieron iniciadores y se utilizaron las siguientes etapas: 94°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto, 74°C durante 1 minuto para 7 ciclos para unir las cadenas pesadas y ligeras. Durante la PCR secundaria descrita anteriormente la cadena pesada y la cadena de ligera se marcan con iniciadores que codifican el elemento de enlace de cadena única. Esta marca contiene 15 nucleótidos en cada una de las cadenas pesadas y ligeras complementarios entre sí y de este modo se permite que el recocido de ambos entre sí. Durante la reacción de extensión se forman moléculas scFv unidas de longitud total. Al final de estos 7 ciclos la temperatura se mantiene en 94°C durante 3 minutos y se añaden los iniciadores exteriores relevantes (SfVHBACK/NotJFOR) para la amplificación de recuperación. Esta amplificación consiste en 10 ciclos: 94°C durante 1 minuto, 74°C durante 2 minutos y sirve para amplificar la pequeña cantidad de producto ligado formado.

#### *Clonación para la expresión, y expresión y purificación del scFv*

Tras el ensamblaje el scFv fue digerido con *SfiI/NotI* tal como se describe (Marks *et. al.*, 1992) y clonado en un vector de expresión del scFv (Hawkins y otros 1992 Mol. Biol. 226, 889-896) en base a pUC119 (Vieira y Messing, 1987). Se preparó un nuevo vector de expresión, pRH2, que tiene la Myc Tag substituida por una marca de hexahistidina para permitir la purificación utilizando cromatografía de afinidad del metal. Esto se realizó mediante mutagénesis dirigida a sitios de PCR invertida (Hemsley y otros, 1989 Nucl. Acids Res. 17, 6545-6551). Los vectores son tal como se muestra en la figura 2 (id. de sec. n<sup>os</sup> 59-62).

Para comprobar la expresión de scFv de longitud total se recogieron y se cultivaron colonias individuales durante cuatro horas con agitación constante en 1 ml 2xTY/0,1% glucosa/100 mg/ml ampicilina a 30°C. En esa etapa se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y la agitación continuó durante 18 horas. El sobrenadante se cultivó por centrifugación a 13.000 rpm en una microcentrifugadora durante 5 minutos. La pastilla bacteriana se congeló a -20°C para la preparación del ADN plásmido y el sobrenadante se analizó mediante *Western Blot* utilizando el anticuerpo anti-Myc 9E10 (Ward y otros, 1989 Nature. 341, 544-546). El ADN plásmido se preparó entonces a partir de la pastilla bacteriana de colonias mostrada así para expresar scFv de longitud total. A partir de esta preparación del plásmido se subclonó el scFv como un fragmento *SfiI/NotI* en pRH2. Se cultivó un litro de bacterias con agitación constante en frascos de 2 litros que contenían 2xTY/0,1% glucosa/100 mg/ml ampicilina a 30°C a un A600nm de 0,9. En esta etapa se añadió IPTG a una concentración final de 1 milímetro y la incubación siguió durante 4 horas más. Las bacterias se dispusieron entonces en píldoras por centrifugación y la fracción periplásmica se preparó según lo descrito por Skerra y otros., (1991 Bio/Technology 9, 273-278).

El fragmento del anticuerpo scFv fue purificado de la fracción periplásmica utilizando la marca de hexahistidina. El procedimiento se basa en el descrito por Skerra y otros, (Skerra y otros, citado anteriormente) pero se encontró que era preferible el uso de seis histidinas y níquel en lugar de cinco histidinas y cinc (datos no mostrados). La preparación periplásmica de un cultivo de 1 litro se introdujo sobre una columna de 1 ml de flujo rápido de sefarosa quelante (Pharmacia) previamente junto con iones de níquel según las instrucciones de los fabricantes. La columna se lavó después con 10 ml de PBS/1M NaCl (pH 7,2) seguido de 5 ml de PBS/1M NaCl/Imidazol 75 mM (pH 7,2). El scFv retenido se eluyó después con 5 ml de PBS/1M NaCl/Imidazol 300 mM (pH 7,2) y se recogió como fracciones de 1 ml. Las fracciones de proteínas máximas fueron identificadas determinando el A280nm y éstas entonces fueron dializadas contra PBS antes del análisis por SDS-PAGE.

#### *PCR, clonación y secuenciado de genes V a partir de nódulo linfático folicular y nódulo linfático normal*

La amplificación de la PCR a del ADN de los especímenes de la biopsia resultó exitosa en todos los casos excepto en la cadena ligera lambda del paciente número 5. Se secuenció una serie de clones de cada paciente. El análisis de las secuencias derivadas del nódulo linfático reactivo y del bazo normal reveló que no existían secuencias repetidas. De cada uno de los nódulos linfáticos portadores de tumor había secuencias repetidas únicas. En la Tabla 2 se muestra un resumen de los resultados de secuenciación. Entre las secuencias repetidas hubo hasta dos cambios de base que se supuso que resultaban de errores de la PCR. Sin embargo, una secuencia de consenso era fácilmente evidente y en cada caso había clones con esta secuencia de consenso. Para confirmar la secuencia se llevó a cabo una segunda amplificación independiente y se secuenciaron otros genes V. Se identificó la misma secuencia de consenso. Las secuencias de genes V repetidas sugieren una extensión clónica y, de este modo, se identifica el gen V del tumor. Para tres de las cinco biopsias tumorales analizadas aquí había disponible un heterohibridoma. La amplificación, reproducción y secuenciación de la PCR confirmó la secuencia identificada directamente del nódulo linfático.

El porcentaje absoluto del gen V derivado del tumor varió y existen varias razones para ello. En primer lugar, las biopsias varían en el grado de infiltración del tumor (aunque en todos los casos aquí examinados las células B malignas

comprenden >50% del total de células presentes). En segundo lugar, los iniciadores variarán en eficacia con la que amplifican cualquier gen particular - en casos extremos como con la cadena ligera lambda en el paciente 4 una cadena puede no amplificar en absoluto. En tercer lugar, algunos pseudogenes pueden ser amplificados por estos iniciadores y esto puede reducir el porcentaje global de genes V derivados del tumor.

5

#### *Ensamblaje, expresión y purificación*

El uso del ensamblaje de la PCR evita el uso de múltiples enzimas de restricción que pueden cortar genes V en sitios internos. Este proceso que se ha utilizado aquí parece ser eficaz y no requiere la preparación separada de un fragmento de un elemento de enlace (Clackson y otros, 1991 Nature 352, 624-628). Para comprobar el proceso de ensamblaje el producto enlazado fue reproducido en un vector de expresión que incluía la Myc Tag (figura 2). Se cultivaron clones seleccionados aleatoriamente y fueron inducidos tal como se ha descrito anteriormente (Hawkins y Winter, 1992). Un análisis *Western Blot* utilizando un anticuerpo monoclonal, 9E10, contra la Myc Tag (Ward y otros, 1989) demostró que el 80% de los clones se expresó correctamente. Para facilitar la purificación el fragmento scFv fue subclonado en el vector de expresión pRH2 que contenía una marca de hexahistidina. Se cultivó un clon del paciente 5 en un volumen de 1L y el fragmento scFV se purificó de la periplasma. La producción se estimó como 0,5 mg/L/OD600 en base a un A280 nm de 1,4 para una solución 1 mg/ml.

#### Ejemplo 2

20

#### *Construcción de una proteína de fusión*

##### *Construcción del plásmido*

El fragmento env *Bam*HI/*Cl*AI (nt 6537-7674, numeración nt de Shinnick y otros, 1981 Nature 293, 543-548) de pCRIP (de O. Danos, Danos & Mulligan 1988 PNAS 85, 6460-6464) se clonó en el fragmento de la espina dorsal de *Bam*HI/*Cl*AI de pZipNeoSV (x) (de R. Mulligan, Cepko y otros., 1984 Cell 37, 1053-1062) para generar un plásmido intermedio penvBam/*Cl*A.

Se introdujo un sitio de reproducción *Sfi*I/*Not*I más allá de la secuencia de péptidos líder entre codones que correspondían a los aminoácidos 6º y 7º (del N terminal) en el polipéptido env de MoMLV maduro. Se utilizó el par de oligonucleótidos envNotrev (5' - CTG CAG GAG CTC GAG ATC AAA CGG GCG GCC GCA CCT CAT CAA GTC TAT AAT ATC-3', id. de sec. nº 49, complementarios al final de envSfifor) y envseq 7 (5' - GCC AGA ACG GGG TTT GGC C-3', id. de sec. nº 50, complemento inverso de MoMLV env nts 6581-6600 de) para iniciar la amplificación (del plásmido pCRIP) de un fragmento 739bp a continuación de un codón ofenv 6. Se utilizó un segundo par de oligonucleótidos, envSfifor (5' - TTT GAT CTC GAG CTC CTG CAG GGC CGG CTG GGC CGC ACT GGA GCC GGG CGA AGC AGT-3', id. de sec. nº 51, complemento inverso de MoMLV env nts 5873-5893 con un saliente 36nt 5' que codifica un sitio de *Sfi*I y 21nt complementario al extremo 5' de envNotrev) y revMLVpol (5'-AAT TAC ATT GTG CAT ACA GAC CC-3', id. de sec. nº 52, complementario a MoMLV pol nts 5277-5249) para iniciar la amplificación (de pCRIP) de un fragmento 702 bpcurso arriba del codón env 7. Las amplificaciones fueron realizadas utilizando polimerasa Vent y las reacciones se sometieron a 15 ciclos de PCR a 94°C durante 1 min, 60°C durante 1 min y 72°C durante 1 min. Los extremos complementarios 21nt de los productos de la PCR purificados en gel 702 y 739 bp permitieron el enlace PCR para generar un fragmento de gen env que incorpora un sitio de clonación *Sfi*I/*Not*I en la posición deseada. Los dos fragmentos fueron mezclados y sometidos a tres ciclos de PCR (94°C, 40°C, 72°C durante 1, 1, y 2 minutos, respectivamente) seguidos de 17 ciclos de amplificación adicionales (94°, 60°, 72° durante 1, 1 y 2 minutos, respectivamente) tras la adición de oligonucleótidos envseq7 y Bglenvrev (5'-TAA TCA CTA CAG ATG TAG ACT GAC ATG GCG CGT-3', id. de sec. nº 53 complementarios a nucleótidos MoMLV pol 5766 a 5785 con el extremo 5' incorporando un sitio de restricción *Bgl*II).

El producto, un fragmento 905bp, fue digerido con *Bgl*II y *Bam*HI y fue clonado en una orientación hacia adelante en el sitio *Bam*HI de penvBam/*Cl*A (véase anteriormente) dando el plásmido pSfi/Notenv. El correcto ensamblaje de este plásmido fue confirmado mediante un análisis de restricción y secuenciación por dideoxi (Sanger y otros., 1977 PNAS 74, 5463-5467). Se subclonó después un anticuerpo funcional scFv B1.8 a partir del vector de expresión procariótica (Hawkins y otros, 1992 J. Mol. Biol. 226, 889-896) como un fragmento *Sfi*I/*Not*I en el sitio de clonación *Sfi*I/*Not*I de pSfi/Not.Env para generar el plásmido pNIP.env (figura 3). La secuencia a través de las uniones del pNIPenv se muestran en la figura 4 (id. de sec. nº 63 a 66, incluyendo la traducción de la secuencia de nucleótidos).

Finalmente, el cassette de expresión de envoltura retroviral modificada fue subclonado como un fragmento *Hind*III/*Eco*RI en un plásmido pSV2Neo modificado (de Ashok Venkitaraman, MRC Centre, Cambridge) para generar el pSVNIPenv del plásmido (figura 4).

##### *Transfección celular*

Los fibroblastos NIH3T3 y la línea celular de empaquetamiento retroviral ecotrópico psi2 (Mann y otros., 1983 Cell 33, 153-159) se mantuvieron en DMEM/10% FBS complementado con 60µg/ml de bencilpenicilina 100µg/ml de estreptomycin a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se volvieron a recubrir dos veces por semana utilizando EDT A sin tripsina para disociar la monocapa.

## ES 2 267 863 T3

El plásmido pNIPenv fue transfectado (con pDCneo, un plásmido que contiene un marcador resistente a la neomicina) en células psi2 por precipitación de fosfato de calcio. Brevemente, se recubrieron  $2 \times 10^5$  células en placas de cultivo de tejido fino de 90 milímetros (Nunc), se cultivaron durante la noche, se lavaron y se introdujeron a 10 ml de un nuevo medio. Se diluyeron  $10 \mu\text{l}$  de ADN plásmido y  $50 \mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  2M ( $0,2 \mu\text{m}$ -filtrado) en agua estéril a un volumen de  $400 \mu\text{l}$ . La mezcla  $\text{CaCl}_2/\text{ADN}$  se añadió gota a gota hasta un volumen igual a  $0,2 \mu\text{m}$ -filtrado 2xHEPES-tamponado de una solución salina ( $\text{NaCl}$  280 mM,  $\text{KCl}$  10 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,5 mM, dextrosa 12 mM, HEPES 50 mM, pH ajustado a 7,05 con  $\text{NaOH}$  0,5N) y se dejaron reposar durante 20 minutos a TA. La solución de transfección (800 ml) se añadió a las células que fueron cultivadas durante 16 horas, lavadas y vueltas a introducir. La selección G418 (1 mg/ml) se inició 24 horas después y continuó durante aproximadamente 2 semanas.

Se identificaron colonias transfectadas que expresaban el anticuerpo de cadena única B1.8 superficial mediante *panning* con bolas recubiertas con NIP.BSA. Brevemente, se recubrieron unas bolas paramagnéticas activadas con tosil (Dynal, Oslo, Noruega, Prod. N° 14004) con NIP10.BSA (aproximadamente 10 moléculas de caproato-O-succinimida acopladas a cada molécula suero albúmina bovina, Hawkins y otros., 1992), se lavaron exhaustivamente en PBS y se bloquearon con DMEM/10% FBS. Se sacudieron lentamente unas placas de tejido de 90 mm que contenían hasta 50 colonias psi2 resistentes a G418 durante 1 hora a  $40^\circ\text{C}$  seguido de 1 hora a temperatura ambiente con  $2 \times 10^7$  ( $50 \mu\text{l}$ ) bolas en 5 ml de DMEM/10% FBS. Tras 5 lavados en PBS, se identificaron con facilidad colonias positivas (altamente recubiertas con bolas paramagnéticas) y se transfirieron fácilmente individualmente para otra expansión, criopreservación y cultivo de los sobrenadantes celulares.

Por lo tanto, se demostraba que la especificidad del anticuerpo se visualiza en la superficie de las células, y por consiguiente que el anticuerpo está plegado.

### Construcción de un vector de expresión de proteína soluble

Para crear un vector de expresión soluble se insertó un codón de terminación y mutación por desplazamiento del marco de lectura entre el gen del anticuerpo y la zona 3' del gen env del MoMLV. El fragmento B1.8 scFv fue amplificado por PCR (10 ciclos,  $94^\circ\text{C}$  1 minuto,  $55^\circ\text{C}$  1 minuto,  $74^\circ\text{C}$  1 minuto) utilizando SfiVHBAK (5'- TAC TCG CGG CCC AAC CGG CCA TGG CCC AGG TSM ARC TGC AGS AGT C-3', id. de sec. n° 54) y un iniciador delantero Not.STOP (5'- AAC AGT TTC TCG GGC CGC CTC CTC AGA GGA C-3', id. de sec. n° 55) que codifica la inserción del nucleótido para crear un codón de terminación y un desplazamiento del marco de lectura 5' del sitio *NotI*. El fragmento fue digerido después con *SfiI/NotI* y clonado en pSfi/Not.Env para crear el plásmido pNIPstop (figura 4). El plásmido pSVBCLenv (figura 4) fue derivado de pSVNIPenv substituyendo el scFv B1.8 por un gen scFv de control que clonado por PCR a partir del linfoma del ratón BCL1. Los genes VH y VL fueron clonados por PCR y ensamblados a partir de ADN derivado de BCL utilizando protocolos estándares.

### Preparación de ADN del plásmido

Se amplificaron plásmidos en *E. coli* - tipo TG1 (Gibson, 1984) extraídos por lisis alcalina y purificados en columnas utilizando el sistema de purificación de ADN Promega Magic Maxipreps® (Promega, Madison, Wis., USA). El ADN se enjuagó en agua. La pureza de la preparación del plásmido fue confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa y midiendo la relación A260 nm/A280 nm (en todos los casos la relación fue  $>1,7$ ). El plásmido purificado fue almacenado a  $-20^\circ\text{C}$ . Antes de uso el plásmido fue ajustado a 160 mg/ml en  $\text{NaCl}$  200 mM.

### Preparación de la proteína scFv B1.8

Para la expresión bacteriana, el gen scFv B1.8 se clonó como fragmento *PstI/NotI* en el vector pRH2, que enlaza un extremo de seis histidinas al terminal C del scFv y se derivó por mutagénesis por PCR inversa. Este plásmido fue transformado en *E. coli* - tipo TG1 y la proteína scFv fue expresada y purificada en una columna de sefarosa NP tal como se ha descrito anteriormente (Hawkins y Winter, 1992. Eur. J. Immunol. 22, 867-870). Se demostró que la proteína purificada se unía fuertemente a NIP-BSA utilizando un BLISA descrito anteriormente (Hawkins y Winter, 1992). Como control negativo se clonó scFvD1.3 (Hawkins y otros, 1992) en el vector de expresión pRH2 y se expresó y después se purificó en una columna de lisozima según describe Hawkins y otros, 1992, (citado anteriormente).

Se utilizaron ratones masculinos BALB/c de 10 semanas de protocolo de vacunación para la inmunización. Se obtuvieron muestras de sangre de pre-inmunización mediante el procedimiento "tail bleeds". La sangre fue centrifugada a 13.000 rpm durante 2 minutos en una microcentrifugadora para separar el suero. El suero se almacenó entonces a  $-20^\circ\text{C}$  para un posterior análisis. Dos grupos de ratones fueron inmunizados, algunos con ADN y algunos con proteína. Los dos grupos fueron Inmunizados tal como se describe a continuación.

- Vacuna de proteína: la proteína scFv B1.8 se ajustó a una concentración de 250 mg/ml en PBS y se mezcló con un volumen igual de CFA. A los ratones se les administró 100 ml de esta vacuna (12,5 mg de scFv) por vía subcutánea en dos sitios separados. Se administraron idénticos refuerzos dos y cuatro semanas después. Se obtuvieron "tail bleeds" de 200 ml 10 días después del refuerzo final. Las muestras de sangre fueron procesadas tal como se ha descrito anteriormente.
- Vacuna de ADN: a dos grupos de tres ratones se les administró 50 ml (8mg) de ADN, por vía subcutánea (sc) a ambos lados, o bien por vía intramuscular (im) (cuádriceps derecho e izquierdo, ADN total para cada

## ES 2 267 863 T3

ratón 16mg). Se proporcionaron dos inoculaciones idénticas de refuerzo en intervalos de una semana. Se obtuvieron “tail bleeds” de 200 ml inmediatamente antes de la primera, la segunda y la tercera agresión y tras una semana del refuerzo final. El suero fue separado y almacenado como se ha descrito anteriormente.

### 5 *Análisis de la reacción inmunológica*

Se recubrieron unas cavidades individuales de fondo plano en unas placas de análisis de 96 cavidades flexibles (Falcon 3912 MicroTest III) con B1.8.His o una proteína scFv (Dl.3.His anti-lisozima) de control a 25 mg/ml durante la noche en PBS a temperatura ambiente. Se ha encontrado que el uso de scFv marcado con histidina para recubrir las placas produce más de la proteína reteniendo su capacidad de enlace al antígeno. Las placas se lavaron x 3 con PBS, se bloquearon durante 2 horas a 37°C con 3% BSA en PBS y se lavaron x 3 en PBS. Se añadió suero de prueba (diluido 1:100 o 1:1000 en PBS/3% BSA) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron x 3 en PBS y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con una segunda capa de anticuerpo Fc de cabra anti-ratón policlonal conjugado con HRP a una dilución de 1:1000 (sigma, cat. no. AO 168) Las placas se lavaron x 4 en PBS, se desarrollaron con ABTS y se midió el A405 nm después de 30 minutos utilizando un lector microplacas Thermomax® (Molecular devices, Menlo Park, USA).

### *Resultados*

#### 20 *Reacción inmunológica a la vacuna de la proteína*

Primero se trató de establecer si los ratones podrían desarrollar una reacción inmunológica humoral anti-idiotípica eficaz al ser agredidos con un anticuerpo de murina scFv en CFA. A seis ratones se les administró 25 mg de scFv B1.8 anti-NIP en CFA, con dosis de refuerzo dos y cuatro semanas después. Diez días después de la agresión final; el suero de estos animales contenía insuficiente anticuerpo anti-B1.8 para dar una señal BLISA positiva a una dilución de 1:100 del suero.

#### *Reacción inmunológica a la vacuna de ADN*

30 El Plásmido pNIPenv (figura 3, véase materiales y procedimientos para los detalles de la construcción) codifica una proteína de fusión quimérica que consiste en el polipéptido env MoMLV ecotrópico Pr80env con un fragmento de anticuerpo scFv anti-NIP (Kd  $4 \times 10^{-8}$  M) añadido a 6 aminoácidos del N terminal. La secuencia líder MoMLV env del aminoácido 33 queda retenida sin disociación del sitio de desdoblamiento líder. Así como los 6 aminoácidos del N terminal de la proteína MoMLV env el scFv también tiene otros 6 aminoácidos derivados del líder pelB restante en el N terminal. La expresión se conduce a partir de secuencias estimuladoras/potenciadoras en la repetición terminal larga (RTL) 5' MoMLV. Las secuencias de señales de poliadenilación vienen proporcionadas por la RTL 3' MoMLV. Al transfectar en fibroblastos de ratón (descrito anteriormente), se encontró que pNIPenv proporcionaba una expresión de superficie celular estable de B1.8 scFv funcional en fusión con la proteína MoMLVenv.

40 A los ratones se les aplicó un iniciador por vía subcutánea (tres ratones) o intramuscular (tres ratones) con 16 mg de pSVNIPenv en NaCl 200 mM, con dosis de refuerzo una y dos semanas más tarde. Se vacunaron ratones de control con pSVBCLenv. Se analizó la respuesta humoral a B1.8scFv de muestras de suero de pre-vacunación, pre-refuerzo y de post-vacunación una semana mediante ELISA. Antes del segundo refuerzo, se detectaron anticuerpos scFv anti-B1.8 a una dilución de 1:100 del suero en tres de los seis ratones vacunados con pSVNIPenv, dos fueron inoculados por vía intramuscular y uno por vía subcutánea. Una semana después del segundo refuerzo, todos los seis ratones presentaban anticuerpos scFv anti-B1.8 detectables con facilidad, los cuales no experimentaron una reacción cruzada con el scFv Dl.3. Los sueros de los ratones vacunados con pBCLenv de control seguían siendo negativos en ELISA anti-B1.8.

#### 50 *Respuesta anamnésica a la vacuna de proteína después de la vacuna de ADN*

Tras 8 semanas, los títulos del anticuerpo anti-B1.8 habían caído en los ratones inmunizados con pSVNIPenv. En este punto, a los tres ratones, inoculados originalmente por vía intramuscular con pNIPenv, se les administró por vía intravenosa 20 mg de proteína scFv purificada B1.8 en PBS. Cinco días después, el suero de estos ratones contenía un título muy aumentado de anticuerpos anti-B1.8 - el aumento promedio era de 12 partes y todos tenían anticuerpos claramente detectables en una dilución de 1:1000.

#### *Refuerzo con vector de expresión soluble de scFv (pNIPstop)*

60 Para analizar si el refuerzo con un vector de expresión de proteína soluble también reforzaría el título del anticuerpo, se les inoculó a los ratones con pNIPstop. Diez semanas después de la inmunización primaria, los tres ratones inmunizados por vía subcutánea con pNIPenv fueron inoculados con 8 mg por vía subcutánea y 8 mg vía intramuscular en NaCl 200 mM. Cinco días después del refuerzo, se obtuvieron “test bleeds” y se les analizó la actividad de los anticuerpos. El título del suero aumentó una media de 10 partes y de nuevo todos fueron ahora positivos en una dilución 1:1000.

## ES 2 267 863 T3

### *Comparación de pNIPstop y pNIPenv soluble en la generación de una reacción inmunológica primaria*

Para demostrar la importancia de la proteína de fusión para mejorar la reacción inmunológica los inventores realizaron un experimento de control para comparar la eficacia de dos vectores en la estimulación de una reacción inmunológica primaria. Se utilizaron dos grupos, cada uno de los cuales consistía en dos ratones BALB/c, como anteriormente. El suero fue obtenido por procedimiento "tail bleeds" como anteriormente y después se inoculó a los ratones 3 x semana con el plásmido apropiado. Veintiocho días después del comienzo de la inmunización, se obtuvo de nuevo suero tras el procedimiento "tail bleeds" y se analizó su actividad anti-B1.8. 2/2 del grupo inoculado con el plásmido pNIPenv fueron positivos en una dilución 1:100 y 2/2 de grupo pNIPstop fueron positivos. Claramente no fue necesaria una marca env para estimular una reacción inmunológica.

### *Confirmación de que la reacción inmunológica reconoce el antígeno nativo*

Un grupo de cinco ratones inmunizados cuatro veces con ADN (pSV2-BCL1) que codifica el fragmento no fundido scFv BCL1 también generó respuestas humorales al idiotipo, tal como se detectó mediante enlace al fragmento BCL1 IgM en un ELISA (no mostrado). Por otra parte, como clara demostración de su capacidad para reconocer un antígeno nativo en la forma requerida para la terapia, un análisis FACS demostró que estos antisueros anti-idiotípicos se enlazan a células linfoides que llevan en la superficie BCL1 Ig. Las células BCL1 fueron incubadas previamente con suero en una dilución 1:20 antes de ser tintadas con anti-ratón conjugado FITC IgG (sigma) y seguido de un análisis FACS. La reacción inmunológica era de hecho comparable a la del anticuerpo BCL1 IgM en CFA (figura 11). Esto se diferenciaba de los antisueros derivados de ratones inmunizados con pSV2-B1.8 que se enlazan solamente de manera débil al linfoma BCL1 (figura 11).

### Ejemplo 3

#### *Construcción de un vector apropiado para el uso en receptores humanos*

##### *Construcción del vector*

Los vectores iniciales utilizados en el ejemplo 2 anterior estaban basados en vectores del virus de la Leucemia Murina de Moloney y contenían grandes tramos de secuencias víricas sin modificar (Russell y otros, 1993 Nucl. Acids Res. 21, 1081-1085). Estos vectores se mostraron eficaces para aumentar respuestas del anti-idiotipo y no proporcionaron ningún efecto adverso en los ratones inoculados. Aunque no hay evidencia de peligro de dichos vectores para el hombre, se decidió modificar los vectores para evitar cualquier riesgo potencial. Había cierta preocupación acerca de dos características de los vectores originales: el gen de envoltura retroviral (ya que teóricamente podría recombinarse en otro retrovirus cambiando así su tropismo) y la señal de empaquetado (que podía permitir el empaquetado de ADN inyectado en retrovirus humanos existentes). Mientras se cambiaba el vector se decidió incorporar cambios que mejorasen los vectores para su uso en el hombre: - el estimulador utilizado para conducir la expresión del scFv idiotípico se cambió por estimulador de Virus del Sarcoma de Rous (RSV) ya que se ha demostrado que proporciona expresión cuando se inyecta directamente en el músculo de un primate no humano (Jiao y otros., 1992 Hum. Gene Ther. 3, 21-33). Los presentes inventores también utilizaron un vector que contiene un origen de replicación de cadena única bacteriano para permitir la producción de ADNss que facilitará la secuenciación de la parte scFv (que es específica para ese paciente individual) del vector antes de inyectar en el paciente. El vector utilizado se basa en un vector disponible en el mercado pRc/RSV (British Biotechnology/Invitrogen).

Para convertir esta espina dorsal del vector en un vector apropiado para la inmunización genética era deseable introducir secuencias líder, señales de terminación y tener en cuenta la producción de proteínas de fusión. Las proteínas de fusión no parecen ser necesarias para la producción de respuestas del anti-idiotipo pero una manera de aumentar la reacción inmunológica podría ser unir proteínas apropiadas -quizás proteínas extrañas o quizás citoquinas (Tao & Levy, 1993 Nature. 362, 755-758). Como que las proteínas de fusión no eran necesarias en modelos animales el ensayo humano inicial utilizará solamente una marca de péptidos cortos pero ésta es una zona para futuras modificaciones potenciales al protocolo.

El vector pSfi/Not.Tag1 fue modificado para substituir el pelB líder por la secuencia líder VH1 de inmunoglobulina humana que permite la codificación de un sitio de clonación SfiI sin modificación de la secuencia de aminoácidos. Ésta se introdujo con oligonucleótidos utilizando los sitios de clonación HindIII/PstI y se confirmó por secuenciación.

Después se clonó como un fragmento EcoRI/Blunt-HindIII en el vector de corte NotI/Blunt - HindIII pRc/RSV para dar la secuencia (id. de sec. nº 56) entre los sitios de HindIII/XbaI, tal como se muestra en la figura 5. El scFv para un paciente individual puede insertarse en los sitios mostrados por el símbolo ^.

El vector fue analizado entonces de dos maneras:

- (i) El scFv B1.8 fue clonado en el vector y entonces la construcción resultante fue transfectada en dos líneas celulares -NSO (una línea celular de mieloma) y NIH 3T3 (una línea celular de fibroblasto). Utilizando el gen de resistencia a la neomicina en pRc/RSV se aislaron transfectantes estables y se analizó la actividad de enlace del sobrenadante al antígeno scFv B1.8. En ambos casos el fragmento del anticuerpo fue expresado y

## ES 2 267 863 T3

enlazado al hapteno NIP- el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal B1.8. Los clones se aislaron de las células transfectadas NSO y se vió que producen 1-3 mg/l de scFv funcional en sobrenadante de cultivo utilizado.

- 5 (ii) El plásmido se utilizó en un experimento de inmunización genética y se comparó con pSV2-B1.8. Proporcionaron resultados comparables y parecen ser superiores a otro vector que codifica la proteína del gen 8 del bacteriófago Fd entre el sitio de *NotI* y *XbaI* (figura 6). La explicación probable es que en experimentos de transfección el nivel de expresión fue 10-100 veces inferior para la fusión del gen 8b scFv B1.8. Otros investigadores han encontrado una fuerte correlación de nivel de expresión y reacción inmunológica cuando se utiliza una inmunización genética para provocar reacciones inmunológicas a proteínas víricas (G. Rhodes, comunicación personal).

15 La figura 6 (inmunización de ratones con vectores utilizando el estimulador RSV) muestra los resultados de inmunización idiopática contra el scFv B1.8. Se muestra la respuesta para ratones individuales tal como se determinó mediante un ELISA en una dilución de suero 1:100. Los ratones fueron inmunizados por vía intramuscular en las semanas 0, 1, 2. Nótese que un ratón con el vector de terminación (pSV2-B1.8) tuvo una respuesta pobre y la respuesta de los ratones inmunizados con el vector de fusión del gen 8 fue pobre (VIII 1 y VIII 2) mientras que ambos con el vector de marca de péptidos proporcionaron buenas respuestas (Marca1 y Marca2).

20 La secuencia (id. de sec. nº 58) del vector final pVAC1 se da en la figura 7 junto con un mapa de los sitios de restricción única (figura 8). La secuencia en letras minúsculas en la figura 7 corresponde a la secuencia que se muestra en la figura 5 a través a los dos codones de terminación. El vector pVAC1 está disponible de los presentes inventores (en el Cambridge Centre for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido).

25 La figura 9 muestra una representación esquemática del vector pVAC1 que indica sitios de restricción importantes y genes importantes.

30 La figura 10 es un gráfico de O.D. (405 nm) frente al tiempo para ratones masculinos y femeninos inmunizados (mediante inyección directa de ADN) con el vector pVAC que expresa B1.8scFv (pVAC1.B1-8). El gráfico muestra que, para ratones individuales, hubo un claro aumento en título tras la inmunización.

35 Aunque el gen resistente a la neomicina es útil para el análisis *in vitro* no es necesario para la inmunización de humanos. El estimulador SV40 utilizado para conducir el gen resistente a la neomicina también está asociado a los mismos riesgos que otros estimuladores potentes. El plásmido que se va a utilizar para los ensayos en humanos tiene así el gen de la neomicina suprimido por un compendio *SfiI/Bst* BI y después una ligadura directa. Esto previene cualquier riesgo.

### Discusión de ejemplos 1-3

40 Los presentes inventores han demostrado que una vacuna de plásmido que codifica un anticuerpo de murina de cadena única/proteína de fusión de envoltura retrovírica induce una fuerte reacción inmunológica humoral al grupo de anticuerpos en ratones BALB/c, mientras que la vacunación con la proteína scFv purificada mezclada con adyuvante completo de Freund's no proporciona ninguna respuesta apreciable. La inducción de la memoria de las células B parece producirse ya que el refuerzo con una proteína soluble o bien un vector de expresión scFv soluble era eficaz en la producción de un rápido aumento del título de anticuerpos.

50 La respuesta humoral anti-B1.8 a la vacuna de plásmido pNIPenv era claramente superior a la producida contra la proteína scFv B1.8 purificada mezclada con adyuvante completo de Freund's. La propuesta que aquí se describe tiene varias ventajas. Tras la transferencia de genes, es probable que exista una fuente continua del antígeno objetivo, disminuyendo después de un período de días o semanas, mientras que la proteína inyectada puede tener una vida media muy corta. Esta exposición prolongada al nuevo antígeno sintetizado puede ser importante para una reacción inmunológica óptima y este argumento se ha utilizado para explicar la superioridad de vacunas víricas vivas en comparación con las muertas.

55 Las células T coadyudantes específicas de antígenos pueden amplificar tanto reacciones inmunológicas humorales como celulares por interacción celular directa y proporcionando citoquinas estimulantes apropiadas. Pueden concebirse varios mecanismos de manera que la vacuna de plásmido pueda reclutar células T coadyudantes de una manera más eficaz.

60 Con independencia de los mecanismos implicados, la estrategia de vacunación utilizada en este estudio proporcionó una potente reacción inmunológica humoral a un fragmento de anticuerpo cadena única débilmente inmunogenético y fue superior a la vacunación con proteína purificada más coadyuvante. El gen scFv utilizado en este estudio podría substituirse por una variedad de genes o fragmentos de genes que codifiquen otros determinantes idiotípicos débilmente inmunogenéticos.

65 Los vectores episomales tales como los basados en virus EBV o papova pueden presentar ventajas frente a vectores corriente. Éstos deben permitir un elevado número de copias de replicación episomal y pueden ser más eficaces. Los

## ES 2 267 863 T3

nuevos vectores que utilizan el inserto pVAC1 *HindIII/XbaI* han sido construidos con el plásmido de expresión pCEP4 (Invitrogen) que contiene el origen de replicación EBV y BBNA. Éstos han proporcionado mayores niveles de expresión y una mayor estabilidad de expresión en experimentos de cultivo de células utilizando la línea de osteosarcoma humano 791T y pueden ser más eficaces *in vivo* aunque también dan lugar a nuevas cuestiones de seguridad para el uso en humanos. Procedimientos más eficientes de transfección tales como el suministro mediado por liposomas y mediado por receptores también pueden mejorar la eficacia del proceso.

### Ejemplo 4

10 *Inmunidad mediada por células T CD4+ contra afecciones de células B*

#### *Ensamblaje de la construcción y caracterización de ScFvPVXCP*

La figura 12 ilustra el ensamblaje de fusiones scFv-PVXCP. Se ensambló scFv del linfoma A31 y el mieloma 5T33 así como A31FrC y se clonaron en pcADN3 previamente (King C.A. y otros, *Nature Medicine*, 4 1281-1286 1998). Los ScFvs fueron fusionados en secuencia con el marco al cuarto codón de PVXCP (aislado CP4) a través de cuatro elementos de enlace de aminoácidos igual que en scFv fusionado al fragmento C (King y otros, 1998). El ADNc de PVXCP fue proporcionado por gentileza del Dr. K. Kanyuka (Long Ashton, LACR, Somerset, y Reino Unido). Los genes de fusión A31PVXCP y 5T33PVXCP se prepararon a través de PCT de dos etapas tal como se ha descrito anteriormente (Spellerberg, 1997) utilizando un equipo de polimerasa HF (Clontech, Basingstoke, Reino Unido). Para ensamblar el gen A31PVX los iniciadores fueron como sigue: para la primera etapa para amplificar el gen A31 5' taatagcactactatagggagac 3' (denominado como T7), era el delantero y 5' ggctggaggtccgggtccacgttgatcctccacctt 3' era el inverso y para amplificar el gen PVXCP 5' aaactgtgaccgggactccagccaacaccactcaagct 3' delantero y 5' accgcccgcctagttatggtggggtagtgaa inverso. El iniciador T7 fue correspondido a secuencias derivadas de plásmido pcADN3. Para la segunda etapa se utilizó T7 como iniciador delantero y un iniciador inverso para el ensamblaje del gen PVXCP como inverso.

Para ensamblar el gen 5T33PVXCP en la primera etapa para el gen 5T33 se utilizó también T7 como iniciador delantero y 5' ggctggaggtccgggtcctttgatttccagcttgg 3' como inverso; para el gen PVXCP se utilizó 5' atcaaaggaccgg gactccagccaacaccactcaagct 3' como iniciador delantero, el iniciador inverso era el mismo que para el ensamblaje del gen A31PVXCP. Para la construcción del gen solo PVXCP (denominado también PVXCP solo), 5' ccgaagctt gcaccatgaagttggtgactgatttctctgtaacactttaaatggtatccaggtccagccaacaccactcaagct 3' era un iniciador delantero y el iniciador inverso era como para las construcciones de fusión. El iniciador delantero contenía secuencias Líder Ig, lo mismo que en scFv A31. Las construcciones ensambladas fueron clonadas en plásmido pcADN3 (invitroGen BV, Leek, Países Bajos) utilizando sitios de restricción *HindIII* y de *NotI*. La expresión de las construcciones ensambladas se comprobó por TNT (Promega) y por transfección de los plásmidos en células COS-1.

Se analizó la PVXCP de sobrenadantes mediante un ELISA utilizando un anticuerpo de recubrimiento anti-PVX IgG policlonal y un anticuerpo de detección anti-PVX IgG policlonal conjugado con fosfatasa alcalina, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Bioreba, Peterborough, Reino Unido). Todas las construcciones que contenían PVXCP produjeron una proteína detectable en los sobrenadantes, mientras que las construcciones que contenían el scFv solo fueron negativas. Se llevó a cabo un SDS-PAGE con un análisis *Western Blot*, y se realizó un sondeo con antisero derivado de ratones vacunados con p.scFv5T33-PVXCP en una dilución 1/100 con una posterior incubación con conjugado de HRP-anti-ratón (Binding Site, Birmingham, Reino Unido) y desarrollo utilizando ECL más reactivo.

#### *Vacunación y agresión tumoral*

Se vacunaron ratones con 6-10 semanas con 50  $\mu$ g de ADN de plásmido en una solución salina en dos sitios en los músculos del cuádriceps, los días 0, 21 y 42, salvo que se indicase lo contrario. El linfoma A31 fue pasado según descrito anteriormente (King, C.A. y otros. *Nat. Med.* 4, 1281-1286. 1998). El mieloma 5T33 fue pasado en ratones C57BL/KaLwRij por inyección intravenosa. La agresión fue en el día 63 por inyección intravenosa con  $10^4$  células 5T33 o con  $5 \times 10^4$  células A31.

#### *Experimentos de reducción*

Se vacunaron ratones 3 veces con p.scFv5T33-PVXCP o p.scFvA31-PVXCP tal como se ha descrito anteriormente. El día 56 los ratones fueron sangrados y se analizó la presencia de anticuerpo anti-5T33 o anti-A31 en los sueros. El día -7, -4, -1 antes de la agresión y el día +2, +5 los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 100  $\mu$ g de anticuerpo anti-CD4 (YTS 191.1.2) o bien anti-CD8 (YTS 169.4.2.1) (Cobbold, S.P., Jayasuriya, A., Nash, A., Prospero T.D. y Waldmann, H. Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets *in vivo*. *Nature* 312 548-551 1984), o IgG de rata normal como control. El día -1 antes o el día +6 después de la agresión, se recogieron células mononucleares sanguíneas periféricas y doblemente marcadas con anti-CD4/anti-CD3 o anti-CD8/anti-CD3 para evaluar la reducción y se analizaron por separación de células activadas por fluorescencia. También se comprobó que ninguno de los anticuerpos de reducción afectaba al comportamiento de los tumores. Se observó la supervivencia de los animales.

*Respuestas de los anticuerpos*

Los niveles de anticuerpos anti-idiotípicos en suero contra IgM del linfoma A31 o IgG del mieloma 5T33 se midieron a través de un ELISA tal como se describe (King C.A. y otros, *Nature Medicine*, 4 1281-1286 1998). Para el anticuerpo anti-PVXCP, PVXCP aislado de viriones purificados del gradiente CsCl (proporcionados por cortesía del Dr. S.M. Angel) utilizando el procedimiento LiCl de Goodman y otros. (Goodman, R.M., Horne, R.W. y Hobart, J.M. Reconstitution of potato virus X *in vitro*. *Virología* 68 299-308 1975) se recubrió en 10 µg/ml, utilizando las mismas condiciones de ELISA. La medición de las subclases IgG1 y IgG2a en anticuerpos de suero de ratón fue como se ha descrito (King C.A. y otros, *Nature Medicine*, 4 1281-1286 1998). Para analizar los anticuerpos anti-PVXCP de sueros de individuos humanos normales se utilizó un ELISA similar, con anticuerpo de IgG anti-humana de cabra conjugado a peroxidasa de rábano silvestre (HRP) (sigma, Poole, Reino Unido) en una dilución a 1:2000 para detección.

*Microscopía electrónica*

Se utilizó microscopía electrónica inmunoabsorbente con unas mallas recubiertas con anti-PVX IgG (Bioreba). Las mallas se tiñeron después negativamente con acetato del uranilo al 1% (peso por volumen) y se examinaron utilizando un microscopio JEOL 1200X.

*La vacunación con la construcción de fusión de ADN (scFv-PVXCP) estimula la producción de anticuerpo anti-Id en modelos de linfoma (A31) y mieloma (5T33)*

Las construcciones que contenían scFv del linfoma del ratón (A31) o del mieloma (5T33) fueron analizadas en ratones singenéticos solos (p.scFv) o fusionados a la secuencia PVXCP (p.scFv-PVXCP). En cada caso, la secuencia scFv sola no pudo inducir niveles significativos de anti-Id capaces de reconocer toda la inmunoglobulina (figura 13 (A) (B)). Sin embargo, los genes de fusión scFv-PVXCP indujeron anticuerpos anti-Id en ambos modelos (A) (B). Los niveles eran variables, con solamente un 30-50% de ratones respondiendo en el modelo de linfoma A31, y un 90-100% en el modelo 5T33. Estos resultados fueron similares en experimentos repetidos. Como era de esperar, el plásmido de control que contenía la secuencia PVXCP sola no indujo anticuerpo anti-Id. Las construcciones que contenían la secuencia PVXCP sola, o bien en fusión, indujeron anticuerpos contra PVXCP (figura 13 (C) (D)), siendo la fusión p.scFv5T33-PVXCP consistentemente más eficaz (D), posiblemente debido a un nivel de expresión más elevado. Para todas las respuestas, hubo un aumento de anticuerpos tras la segunda inyección el día 21, y un pequeño aumento adicional tras la tercera inyección el día 42. El análisis de los sueros mezclados para subclases de inmunoglobulina de anticuerpos contra scFv o PVXCP mostró una dominancia de IgG2a, con solamente niveles muy bajos de IgG1. En el modelo A31, no pudo detectarse IgG1, y en el modelo 5T33, las relaciones IgG1:IgG2a para anti-Id o anti-PVXCP fueron 0,08:1 y 0,02:1, respectivamente.

*Las construcciones de fusión de ADN inducen inmunidad protectora contra linfoma y mieloma*

La vacunación de ratones singenéticos con construcciones de fusión p.scFv-PVXCP indujeron una inmunidad protectora contra el linfoma (A31) y el mieloma (5T33) (figuras 14A y 16B). En cada caso, el p.scFv solo fue ineficaz, y el control de p.PVXCP fue negativo. Para el linfoma, en el cual se detectaron anticuerpos anti-Id en solamente un ~50% de ratones, todos mostraron protección, indicando la necesidad de muy poco o ningún anticuerpo. Los experimentos de protección se han repetido tres veces con resultados similares. En el modelo A31, algunos ratones desarrollaron linfoma en una última etapa (>90 días), pero no hubo una clara correlación entre la supervivencia a largo plazo y los niveles de anticuerpos en la agresión. Es necesaria una investigación adicional para evaluar el mecanismo de escape en esta última etapa. En ambos modelos, la inyección de plásmidos separados que codifican scFv o PVXCP no pudo inducir protección, demostrando la necesidad de fusión (datos mostrados para modelos 5T33 en la figura 15).

*La protección contra linfoma y mieloma implica células T CD4+*

Para el linfoma A31, la reducción de células T CD4+ tras la vacunación, por inyección repetida del anticuerpo monoclonal anti-CD4 (mAb), anuló completamente la protección (figura 16A). Esto contrasta con los resultados utilizando una construcción que contiene una secuencia scFv fusionada a una secuencia que codifica el fragmento C de toxina tetánica (scFv-FrC). Tal como se ha informado con anterioridad (King C.A. y otros, *Nature Medicine*, 4 1281-1286 1998), y confirmado en la figura 16B, esta construcción induce la protección contra el linfoma A31. Sin embargo, la reducción de células T CD4+ no anula esta protección (figura 16B), y por lo tanto depende probablemente del anticuerpo. Parece ser que el anticuerpo puede ser menos crítico para la protección inducida por scFv-PVXCP. En el modelo del mieloma, la protección inducida por la construcción scFv-PVXCP fue anulada de nuevo por la reducción de células T CD4+ (figura 17). Este resultado es coherente con la ineficacia del anticuerpo anti-Id en la protección contra un tumor Ig-ve superficial, y con la implicación de un mecanismo celular. No hubo efecto sobre la protección contra mieloma cuando se redujeron las células T CD8+ (figura 17). El papel de las células T CD8+ en la protección contra el linfoma A31 fue más difícil de evaluar puesto que, a diferencia de 5T33, la reducción tuvo cierto efecto sobre el crecimiento del tumor A31.

*La proteína de fusión ScFv-PVXCP forma partículas autoagregantes*

Para investigar la naturaleza molecular de la proteína de fusión scFv-PVXCP expresada, las construcciones fueron transfectadas en células Cos-1 y se recogieron los sobrenadantes. La proteína de fusión del mieloma 5T33 fue expre-

sada en el nivel más alto (~50 ng/ml), y esto se seleccionó por lo tanto para una investigación adicional. Utilizando un ELISA para detectar la proteína PVXCP, encontramos que una centrifugación a 40.000 rpm (135.000 x g) durante 2 horas sedimentaba toda la reactividad PVXCP detectable, indicando que la proteína de fusión era de un gran tamaño molecular. Se obtuvo un resultado similar utilizando PVXCP solo derivado de planta. Como que la proteína de fusión o el PVXCP libre podrían ser resueltos por SDS-PAGE a monómeros de los tamaños previstos de 54 KD o 24 KD respectivamente (figura 18A), las proteínas expresadas deben experimentar una auto-agregación, supuestamente mediada por el componente PVXCP. Los sobrenadantes que contenían scFv-PVXCP expresado o proteínas PVXCP fueron examinados por microscopia electrónica utilizando inmunocaptura con anti-PVX IgG. Los agregados eran perceptibles (figura 18B) con un aspecto similar al del PVXCP aislado de las partículas del virus, lo que refleja la tendencia bien documentada de proteínas de revestimiento de *Potexvirus* al autoagregado. Bajo condiciones fisiológicas, el PVXCP forma agregados que comprenden discos de dos capas con 9 subunidades por capa, y sus pilas (Goodman, R.M., Horne, R.W. y Hobart, Reconstitution of potato virus X *in vitro*. *Virology* 68 299-308 1975, Erikson, J.W., Bancroft, J.B. y Stillman, Circular dichroism studies of papaya mosaic virus coat protein and its polymers. *J. Mol. Biol.* 147 337-349 1981). Parece que la fusión de scFv no cambia la forma o el tamaño de los agregados, y que el scFv fusionado a PVXCP presentará múltiples copias en los agregados PVXCP. Según lo esperado, bajo las condiciones de expresión, en ausencia de ARN vírico, las subunidades PVX CP no forman hélices de tipo vírico.

#### Discusión del ejemplo 4

Las construcciones de ADN proporcionan una plataforma para la manipulación de genes derivados de tumor, con el propósito de una óptima presentación del antígeno codificado al sistema inmunológico (Gurunathan, S., Klinman, D.M. y Seder, DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 927-974 2000). Para el cáncer, las vacunas de ADN permiten un análisis rápido de la capacidad de secuencias seleccionadas para inducir mecanismos efectores capaces de suprimir el crecimiento del tumor en los sistemas modelo. Para antígenos idiotípicos de tumores de células B, ya quedó claro que las construcciones simples que contenían scFv solo no podían inducir respuestas anti-Id significativas (Stevenson, F.K. y otros. Idiotypic DNA vaccines against B-cell lymphoma. *Immunol. Rev.* 145, 211-228 1995), pero esa fusión de la secuencia FrC de la toxina tetánica condujo a la estimulación de una inmunidad protectora contra el linfoma y el mieloma (King C.A. y otros, *Nature Medicine*, 4 1281-1286 1998). Sin embargo, la mayoría de pacientes tendrá una inmunidad preexistente contra la toxina tetánica, y, aunque esto no parece prevenir la inducción de la inmunidad contra el gen de fusión scFv-FrC (King C.A. y otros, *Nature Medicine*, 4 1281-1286 1998), podría afectar a las vías inducidas. Los inventores eligieron por lo tanto investigar un gen de estimulación alternativo, derivado de una proteína de revestimiento vírico de plantas (PVXCP). A diferencia de FrC, no se detectó ningún anticuerpo contra PVXCP en sueros humanos (datos no mostrados). Por lo tanto, no habría ningún anticuerpo preexistente en la etapa de iniciación, aunque dicho anticuerpo podría desarrollarse tras la vacunación. Sin embargo, independientemente del hecho de que éste sea un antígeno primario en seres humanos, los inventores han encontrado que el gen de fusión scFv-PVXCP genera un mecanismo protector mediado por células T CD4+ distinto contra tumores de células B.

El requerimiento para la fusión de las proteínas scFv y PVXCP para estimular una respuesta específica de células T aparece ser un ejemplo de "ayuda ligada de células T". Este fenómeno, en el cual un determinante inmunológicamente silencioso puede hacerse inmunogénico si está ligado a un antígeno derivado de un patógeno dominante, se ha descrito para un péptido de mucina (MUC-1) ligado a un péptido derivado de parásitos, suministrado dentro de una molécula de Ig entera (Gerloni, M. y otros. Functional Cooperation between T helper cell determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13269-13274 2000). Aunque en ese modelo ambos epitopos eran extraños, y no se evaluó la protección del tumor, se demostró claramente la activación de las células T CD4+ por enlace, con el mecanismo probablemente implicando la inducción de la capacidad coestimuladora de las células que presentan antígenos (Gerloni, M. y otros. Functional Cooperation between T helper cell determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13269-13274 2000). Aquí, los inventores han demostrado que las células T CD4+ contra un antígeno de tumor autólogo ligado también pueden ser estimuladas mediante este mecanismo. La población de células T CD4+ parece ser capaz de proteger contra el linfoma, y resulta claramente crítica para la protección contra el mieloma superficial Ig-ve.

Una característica de la proteína de fusión scFv-PVXCP expresada es que forma agregados, incluyendo construcciones apiladas en discos (Goodman, R.M., Horne, R.W. y Hobart, Reconstitution of potato virus X *in vitro*. *Virology* 68, 299-308 1975). Se sabe que la activación de la reacción inmunológica está influenciada por la forma molecular del antígeno, siendo los agregados grandes particularmente inmunogénicos, supuestamente porque los patógenos presentan comúnmente esta construcción (Zinkernagel R.M., Immunology and autoimmunity studied with viruses. en *The molecular basis of cellular defence mechanisms* 105-129 Wiley, Chichester, 1997). Para vacunas de ADN, todavía no se sabe si la ruta principal de presentación *in vivo* implica la exportación de células del músculo transfectadas (Ulmer, J.B., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Donnelly, J.J. y Liu M.A., Generation of CMH class I-restricted cytotoxic lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology* 89, 59-67 1996, Corr, M., von Damm, A., Lee, D.L. y Tighe H., La iniciación *in vivo* por ADN se produce predominantemente por transferencia del antígenos. *J. Immunol.* 163, 4721-4727 1999) o presentación directa por APCs transfectadas (Condon, C., Watkins, S.C., Celluzzi, C.M., Thompson, K. y Falo, L.D., Jr. DNA-based immunization by *in vivo* transfection of dendritic cells. *Nat. Med.* 2, 1122-1128 1996, Casares, S., Inaba, K., Brumeanu, T.D., Steinman, R.M. y Bona C.A. Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J. Exp. Med.* 186, 1481-1486 1997). Todas las construcciones incorporan una secuencia líder, y las proteínas de fusión se pueden exportar de células COS-1. Sin embargo, la fusión PVXCP da lugar a un resultado inmune diferente respecto al fragmento C de la toxina tetánica. Para scFv-PVXCP, la respuesta

del anticuerpo anti-Id es casi totalmente de la subclase de IgG2a, mientras que la fusión de scFv-FrC induce un alto nivel de IgG1 (King C.A. y otros, *Nature Medicine*, 4 1281-1286 1998). En el modelo 5T33, la fusión PVXCP indujo anti-Id con una relación IgG1:IgG2a de 0,08:1, contrastando dramáticamente con la relación 28:1 inducida por scFv-FrC (King C.A. y otros, *Nature Medicine*, 4 1281-1286 1998). Esto sugiere que el antígeno agregado amplifica la respuesta dominada por T<sub>H</sub>1 ya activada por el entorno de citoquinas generado por inyección de ADN (Roman, M. y otros. Immunoestimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat. Med.* 3, 849-854 1997). La inducción de una respuesta dominante de IgG2a también se ha observado utilizando péptidos ligados a partículas de virus quiméricas (McInerney, T.L., Brennan, F.R., Jones, T.D. y Dimmock N. J., Analysis of the ability of five adjuvants to enhance immune responses to a chimeric plant virus displaying an HIV-1 peptide. *Vaccine* 17, 1359-1368 1999).

Los principios de la amplificación de reacciones inmunológicas contra antígenos tumorales por acoplamiento genético pueden aplicarse ampliamente. Para las vacunas de ADN, los inventores ya han demostrado que la estimulación de respuestas de anticuerpos contra varios antígenos tumorales, incluyendo MUC-1 y antígeno carcinoembrionario, puede conseguirse mediante fusión con FrC 30. Stevenson, F.K. y otros. Genetic vaccination against defined tumour antigens of B-cells malignances *Rev. Clin. Exp. Hematol.* 9 2-21 1999). Parece que PVXCP puede ser superior en la amplificación de respuestas de células T CD4+ contra antígenos tumorales ligados, y éstas se están analizando. La estimulación de las respuestas de células T CD8+ también puede producirse por enlace, y aunque las secuencias scFv de murina contienen pocos o ningún péptido de enlace a CMH clase I candidato (Zhu, D. y otros. Immunoglobulin V<sub>H</sub> gene sequence analysis of spontaneous murine immunoglobulin-secreting B-cell tumours with clinical features of human disease. *Immunology* 93, 162-170 1998), éstos pueden encontrarse en otros antígenos tumorales. Está claro que existen muchas vías efectoras que podrían actuar contra células cancerosas, y que pueden seleccionarse genes de fusión para activar las más apropiadas para el antígeno objetivo.

En resumen, los presentes inventores han fusionado genéticamente PVXCP a un antígeno asociado al linfoma (scFv-A31) y han utilizado la construcción para la vacunación de ADN de ratones. Esto condujo a elevadas respuestas de anticuerpos y protección contra agresión con linfoma A31. Además, los inventores han demostrado que esta protección fue mediada por células positivas CD4. Esto contrasta con la vacunación de ADN utilizando la fusión de FrC a scFv-A31, en la que dicha protección se encuentra mediada solamente por el anticuerpo a scFv. Los inventores también han fusionado un antígeno específico del mieloma scFv-5T33 a PVXCP con posterior vacunación de ratones con la construcción. Esto dio lugar a la inducción de una respuesta del anticuerpo contra scFv-5T33 y la protección contra agresión con mieloma 5T33. Los inventores también han determinado que dicha protección contra el mieloma fue mediada por células T positivas CD4. Esta reducción se obtuvo utilizando anticuerpos anti-CD4+ para eliminar las células antes de agresión por el tumor.

Los inventores han concluido que las proteínas de revestimiento vírico de plantas, por ejemplo PVXCP, pueden actuar como secuencia adyuvante para la inducción de una inmunidad protectora contra por lo menos el linfoma y el mieloma. Han observado además que existe una cierta distinción entre PVXCP y FrC, tanto en términos de construcción molecular como en términos de vías de inmunidad inducida a través de la vacunación de ADN.

#### Ejemplo 5

##### *Propiedades inmunogenéticas de PVXCP- vacuna de fusión en un modelo de linfoma BCL1*

Los inventores evaluaron las propiedades inmunogenéticas de vacunas de ADN basadas en PVXCP en otro modelo de linfoma BCL1, que es similar al modelo de linfoma A31 del ejemplo 4 y también muestra una inmunoglobulina específica del tumor en la superficie de la célula.

El scFv derivado de la inmunoglobulina tumoral BCL1 fue fusionado a PVXCP después del procedimiento descrito en el Ejemplo 4. Los ratones fueron vacunados con la vacuna p.scFvBCL1-PVXCP resultante, lo cual generó respuestas de los anticuerpos contra inmunoglobulina BCL1 y protegió los ratones tras la agresión con el tumor BCL1. Los resultados se muestran en la figura 19.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Construcción de ácido nucléico para el suministro en células vivas *in vivo* para inducir una reacción inmunológica en un paciente a un antígeno; dirigiendo la construcción la expresión de una proteína de fusión, comprendiendo dicha proteína de fusión el citado antígeno y un coadyuvante, **caracterizada** por el hecho de que dicho coadyuvante es una proteína de revestimiento del virus X de la patata (PVXCP).
- 10 2. Construcción de ácido nucléico según la reivindicación 1, **caracterizada** por el hecho de que dicho coadyuvante estimula una respuesta de células T coadyudantes.
3. Construcción de ácido nucléico según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizada** por el hecho de que dicho coadyuvante comprende un epítipo de células T coadyudantes.
- 15 4. Construcción de ácido nucléico según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizada** por el hecho de que dicho antígeno es un autopolipéptido o un autopolipéptido alterado de dicho paciente.
5. Construcción de ácido nucléico según la reivindicación 4, **caracterizada** por el hecho de que dicho autopolipéptido o autopolipéptido alterado es un antígeno asociado a un tumor.
- 20 6. Construcción de ácido nucléico según la reivindicación 5, **caracterizada** por el hecho de que dicho antígeno asociado a un tumor es un determinante idiotípico de un receptor de células T expresado en la superficie de una célula T maligna.
- 25 7. Construcción de ácido nucléico según la reivindicación 5, **caracterizada** por el hecho de que dicho antígeno asociado al tumor es un determinante idiotípico de una célula B maligna.
8. Construcción de ácido nucléico según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, **caracterizada** por el hecho de que dicho determinante idiotípico se expresa como fragmento Fv de cadena única.
- 30 9. Construcción de ácido nucléico según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizada** por el hecho de que dicho antígeno está derivado de un patógeno.
10. Construcción de ácido nucléico según la reivindicación 9, **caracterizada** por el hecho de que dicho patógeno es un virus.
- 35 11. Procedimiento para preparar una construcción de ácido nucléico para producir una reacción inmunológica contra un antígeno, comprendiendo dicho procedimiento:
- 40 identificar una secuencia de ácido nucléico que codifica dicho antígeno;
- clonar dicha secuencia de ácido nucléico; e
- introducir el ácido nucléico clonado en un vector, permitiendo dicho vector que el antígeno sea expresado como una fusión con un coadyuvante, en el que dicho coadyuvante es PVXCP.
- 45 12. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** por el hecho de que dicho antígeno es un autopolipéptido o un autopolipéptido alterado.
- 50 13. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** por el hecho de que dicho antígeno es un antígeno asociado a un tumor.
14. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** por el hecho de que dicho antígeno se deriva de un patógeno.
- 55 15. Procedimiento para producir una construcción de ácido nucléico para tratar a un paciente que padece una afección de células B, comprendiendo dicho procedimiento:
- 60 identificar una secuencia de ácido nucléico que codifica un determinante idiotípico presente en las células B malignas del paciente mediante análisis de una muestra de células del paciente;
- clonar la secuencia de ácido nucléico que codifica el determinante idiotípico; e
- introducir el ácido nucléico clonado en un vector, permitiendo dicho vector que el antígeno sea expresado como una fusión con un coadyuvante, en el que dicho coadyuvante es PVXCP.
- 65 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11-15, **caracterizado** por el hecho de que la citada proteína de revestimiento vírico de plantas comprende un epítipo de células T coadyudantes.

## ES 2 267 863 T3

17. Construcción de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en un procedimiento de tratamiento médico.

5 18. Uso de una construcción de ácido nucleico según de las reivindicaciones 1 a 10 en la preparación de una vacuna para tratar o prevenir un estado de enfermedad asociada al citado antígeno.

10 19. Uso según la reivindicación 18 cuando depende de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, **caracterizado** por el hecho de que el determinante idiotípico se clonó a partir de muestras obtenidas del paciente al cual se le va a administrar la vacuna.

15 20. Uso según la reivindicación 18 o la reivindicación 19, **caracterizado** por el hecho de que el ácido nucleico es sin cápsida.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

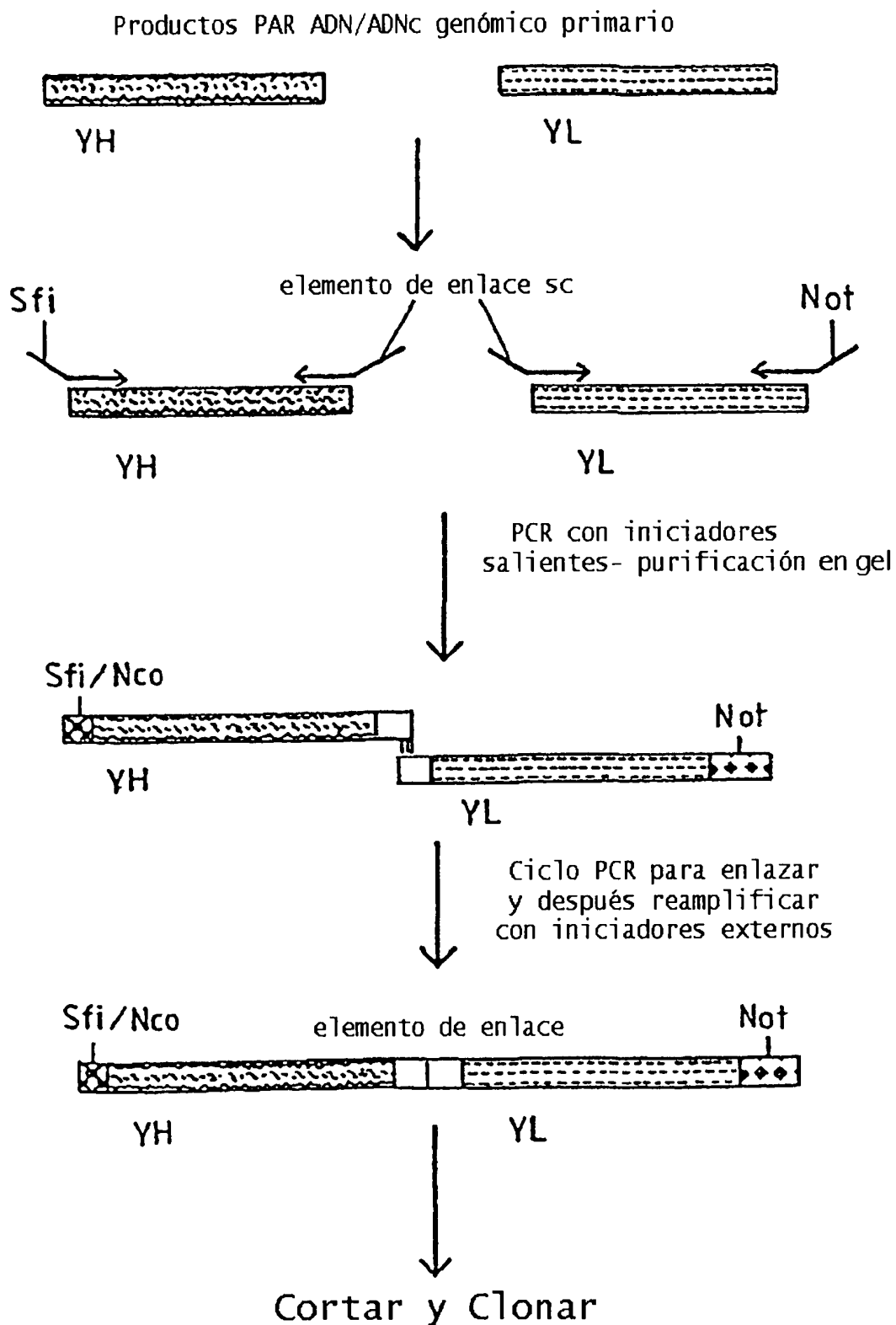


FIG.1

ES 2 267 863 T3

I) Vector con Myc Yag

rbs
M K Y L L P T A A  
GCATGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCC  
10
20
30
40
50
60

SphI

PelB líder

A G L L L L A A O P A M A Q V Q L Q V D  
GCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGTCGAG  
70
80
90
100
110
110

SfiI

PstI SalI

Myc Tag (TAG1)

L E I K R A A A E O K L I S E E D L N \*  
CTCGAGATCAAACGGGCGCGCCAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATTAA  
120
130
140
150
160
170

XhoI

NotI

TAAGAATTC

EcoRI

II) Vector con Histidina Tag (pRH2)

rbs
M K Y L L P T A A  
GCATGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCC  
10
20
30
40
50
60

SphI

PelB líder

A G L L L L A A O P A M A Q V Q L Q V G  
GCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGTCGGC  
70
80
90
100
110
110

SfiI NcoI

PstI

L E I K R A A A H H H H H H \* \*  
CTCGAGATCAAACGGGCGCGCCACATCACCATCATCACCATTAATAAGAATTC

120

130

140

150

160

XhoI

NotI

EcoRI

FIG. 2

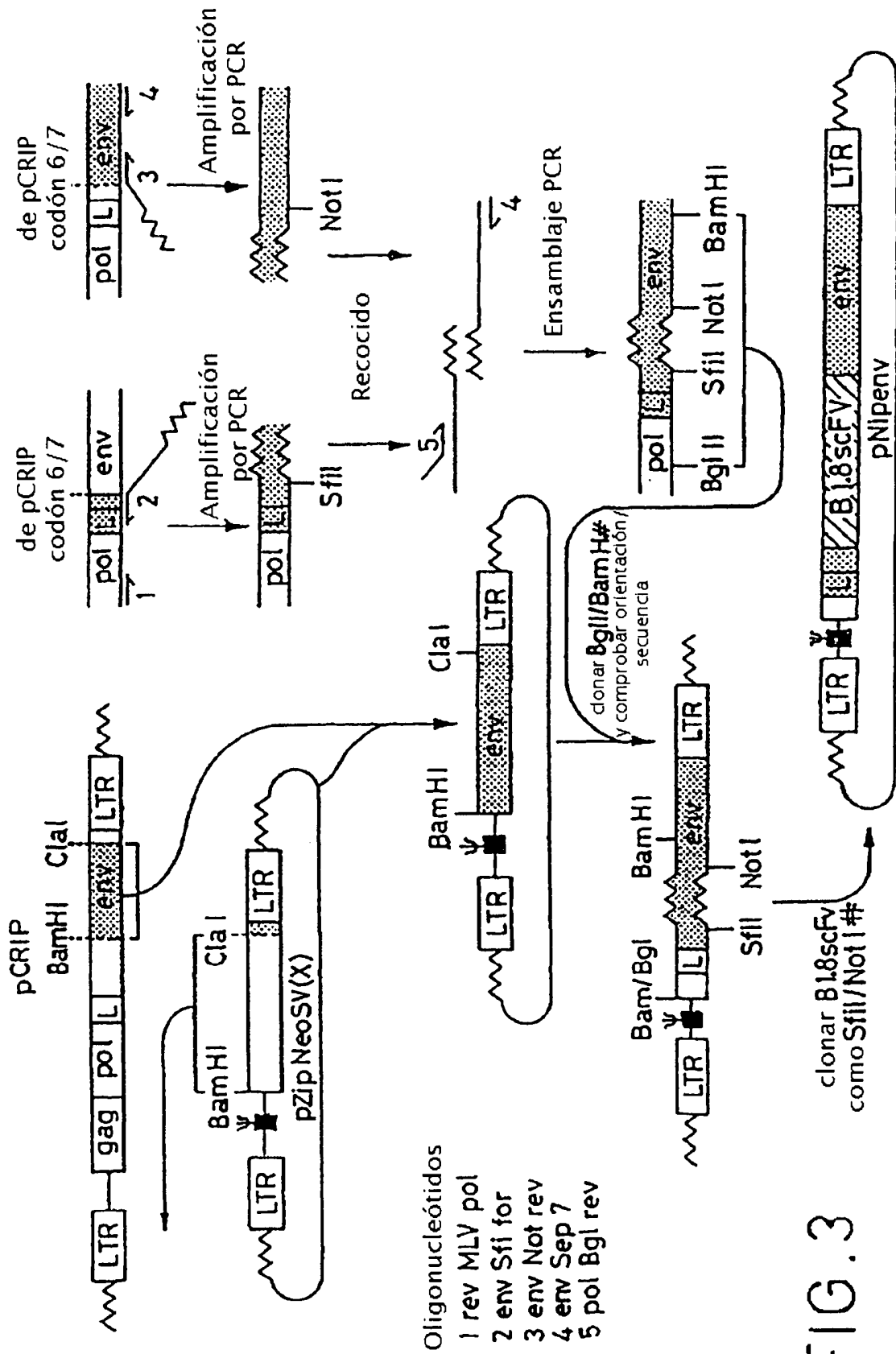


FIG. 3

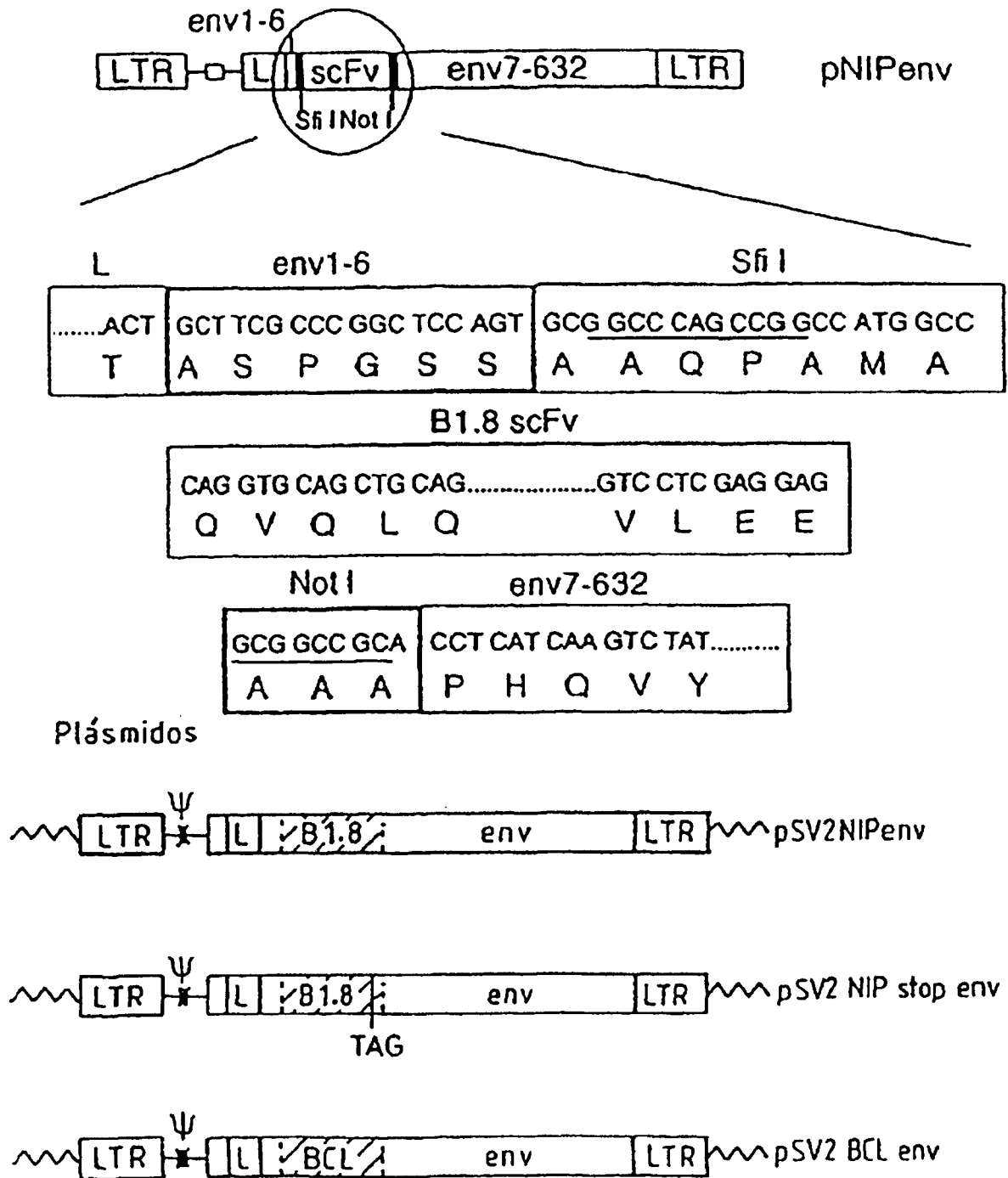


FIG.4

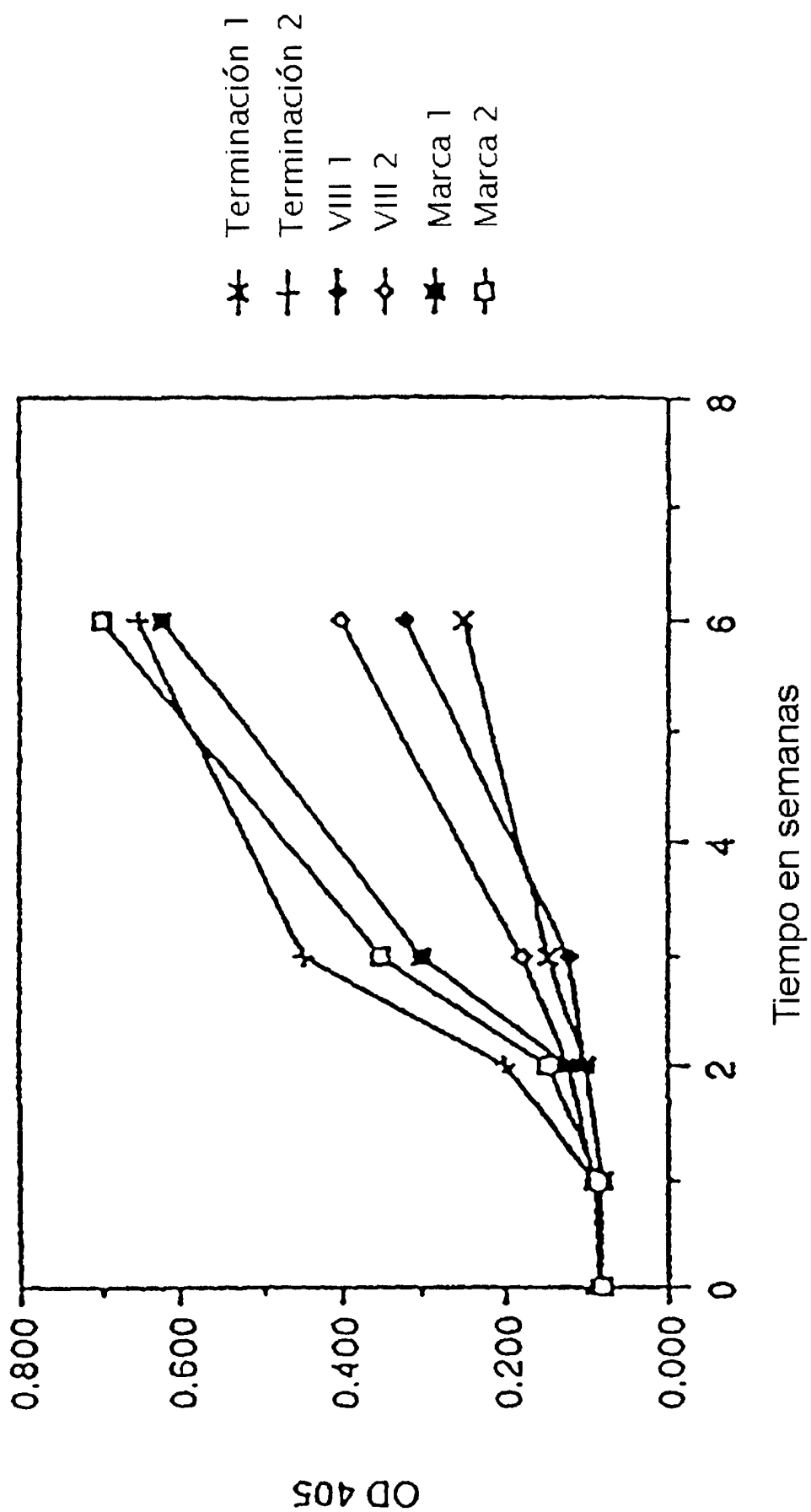
FIG. 5

```

pVACI
Hind III
AAG CTT AGC ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TGC TTG CTG GCT
K L S M D W T W R V F C L L A
<-----VHI leader----->
^
Sfi I
GTG GCC CCG GGG GCC CAC TCC CAG GTG CAG CTG CAG GTC GAC CTC
V A P G A H S
----->
^ Not I
GAG ATC AAA CCG GCG GCC GCA AGC GCT TGG CGT CAC CCG CAG TTC
E I K R A A A S A W R H P Q F
GGT GGT TAA TAA GAA TTG CTC GAG CAT GCA TCT AGA G....
G G * *
Xba I

```

FIG. 6



## FIG 7(i)

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |

1 GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTCGACTCT CAGTACAA'IC  
 51 TGCTCTGATG CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT  
 101 GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG CGAGCAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG  
 151 GCTTGACCGA CAATTGCA'ATG AAGAATCTGC TTAGGGTTAG GCGTTTTGCG  
 201 CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTATCTGAG GGGACTAGGG  
 251 TGTGTTTAGG CGAAAAGCGG GGCTTCGGTT GTACGCGGTT AGGAGTCCCC  
 301 TCAGGATATA GTAGTTTCGC TTTTGCATAG GGAGGGGGAA ATGTAGTCTT  
 351 ATGCAATACA CTTGTAGTCT TGCAACATGG TAACGATGAG TTAGCAACAT  
 401 GCCTTACAAG GAGAGAAAAA GCACCGTGCA TGCCGATTGG TGGAAGTAAG  
 451 GTGGTACGAT CGTGCCTTAT TAGGAAGGCA ACAGACAGGT CTGACATGGA  
 501 TTGGACGAAC CACTGAATTC CGCATTGCAG AGATAATTGT ATTTAAGTGC  
 551 CTAGCTCGAT ACAATAAACG CCATTTGACC ATTCACCACA TTGGTGTGCA  
 601 CCTccaagct tagcatggac tggacctgga gggctctctg cttgctgget  
 651 gtggccccgg gggcccactc ccaggtgcag ctgcaggtcg acctcgagat  
 701 caaacgggcg gccgcaagcg cttggcgctca cccgcagttc ggtgggtaat  
 751 aagaattggc cgctcgagca TGCATCTAGA GCTCGCTGAT CAGCCTCGAC  
 801 TGTGCCITCT AGTTGCCAGC CATCTGTGT' TTGCCCTCC CCCGTGCCTT  
 851 CCTTGACCCT GGAAGGTGCC ACTCCCCTG TCC'ITTCCTA ATAAAA'IGAG  
 901 GAAATTGCAT CGCATTGTCT GAGTAGGTGT CATTCTATTC TGGGGGGTGG  
 951 GGTGGGGCAG GACAGCAAGG GGGAGGATTG GGAAGACAAT AGCAGGCATG  
 1001 CTGGGGATGC GGTGGGCTCT ATGGAACCAG CTGGGGCTCG AGGGGGGATC  
 1051 CCCACGCGCC CTGTAGCGGC GCATTAAGCG CGGCGGGTGT GGTGGTTACG  
 1101 CGCAGCGTGA CCGCTACACT TGCCAGCGCC CTAGCGCCCG CTCCITTCGC  
 1151 TTTCTTCCCT TCCTTTCTCG CCACGTTGCG CGGCTTTCCC CGTCAAGCTC  
 1201 TAAATCGGGG CATCCCTTTA GGGTTCGAT TTAGTGCTTT ACGGCACCTC  
 1251 GACCCCAAAA AACTTGATTA GGGTGATGGT TCACGTAGTG GGCCATCGCC  
 1301 CTGATAGACG GTTTTTCGCC CTTTGACGTT GGAGTCCACG TTCTTTAATA  
 1351 GIGGACTCTT GTTCCAAACT GGAACAACAC TCAACCCTAT CTCGGTCTAT

## FIG. 7(ii)

1401 TCTTTTGATT TATAAGGGAT TTTGGGGATT TCGGCCTATT GGT'AAAAAA  
 1451 TGAGCTGATT TAACAAAAAT TTAACGCGAA TTTTAAACAAA ATA'TAACGT  
 1501 TTACAATTA AATATTTGCT TATACAATCT TCC'GT'TTTT GGGGCTTTTC  
 1551 TGATTATCAA CCGGGGTGGG TACCGAGCTC GAATTCTGTG GAATGTGTGT  
 1601 CAGTTAGGGT GTGGAAAGTC CCCAGGCTCC CCAGGCAGGC AGAAGTATGC  
 1651 AAAGCATGCA TCTCAATPLAG TCAGCAACCA GGTGTGGAAA GTCCCCAGGC  
 1701 TCCCCAGCAG GCAGAAGTAT GCAAAGCATG CATCTCAATT AGTCAGCAAC  
 1751 CATAGTCCCG CCCCTAACTC CGCCCATCCC GCCCCTAACT CCGCCCAGTT  
 1801 CCGCCCATTC TCCGCCCCAT GGCTGACTAA TTTTTTTTAT TTATGCAGAG  
 1851 GCCGAGGCCG CGAAATGACC GACCAAGCGA CGCCCAACCT GCCATCACGA  
 1901 GATTCGATT CCACCGCCGC CTTCTATGAA AGGTTGGGCT TCGGAATCGT  
 1951 TTTCCGGGAC GCCGGCTGGA TGATCCTCCA GCGCGGGGAT CTCATGCTGG  
 2001 AGTTCTTCGC CCACCCCAAC TTGTTTATTG CAGCTTATAA TGGTTACAAA  
 2051 TAAAGCAATA GCATCACAAA TTTCACAAAT AAAGCATT'TT TTCACTGCA  
 2101 TTCTAGTTGT GGTTTGTCCA AACTCATCAA TGTATCTTAT CATGTCTGGA  
 2151 TCCCGTCGAC CTCGAGAGCT TGGCGTAATC ATGGTCATAG CTGTTTCTG  
 2201 TGTGAAATTG TTATCCGCTC ACAATTCCAC ACAACATACG AGCCGGAAGC  
 2251 ATAAAGTGTA AAGCCTGGGG TGCCTAATGA GTGAGCTAAC TCACATTAAT  
 2301 TGC GTTGC GC TCACTGCCCC CTTTCCAGTC GGGAAACCTG TCGTGCCAGC  
 2351 TGCATTAATG AATCGGCCAA CGCGCGGGGA GAGGCGGFTT GCGTATTGGG  
 2401 CGCTCTCCG CTTCTCGCT CACTGACTCG CTGCGCTCGG TCGTTCGGCT  
 2451 GCGGCGAGCG GTATCAGCTC ACTCAAAGGC GGTAATACGG TTATCCACAG  
 2501 AATCAGGGGA TAACGCAGGA AAGAACATGT GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG  
 2551 GCCAGGAACC GTAAAAAGGC CGCGTTGCTG GCGTTTTTCC ATAGGCTCCG  
 2601 CCCCCCTGAC GAGCATCACA AAAATCGACG CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA  
 2651 ACCCGACAGG ACTATAAAGA TACCAGGCGT TCCCCCTGG AAGCTCCCTC  
 2701 GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT ACCGGATACC TGTCCGCTT  
 2751 TCTCCCTTCG GGAAGCGTGG CGCTTCTCA ATGCTCACGC TGTAGGTATC  
 2801 TCAGTTCGGT GTAGGTCGTT CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC  
 2851 CCGTTCAGC CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTA'ACTATC GTC'FGAGTC  
 2901 CAACCCGGTA AGACACGACT TATCGCCACT GGCAGCAGCC ACTGGTAACA  
 2951 GGATTAGCAG AGCGAGGTAT GTAGGCGGTG CTACAGAGTT CTTGAAGTGG  
 3001 TGGCCTAACT ACGGCTACAC TAGAAGGACA GTATTTGGTA TC'GCGCTCT

## FIG. 7(iii)

3051 GCTGAAGCCA GTTACCTTCG GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT TGATCCGQCA  
3101 AACAAACCAC CGCTGGTAGC GGTGGTTTTT TTGTTTGCAA GCAGCAGATT  
3151 ACGCGCAGAA AAAAAGGATC TCAAGAAGAT CCTTTGATCT TTTCTACGGG  
3201 GTCTGACGCT CAGTGGAAACG AAAACTCACG TTAAGGGATT TTGGTCATGA  
3251 GATTATCAAA AAGGATCTTC ACCTAGATCC TTTTAAATTA AAAATGAAGT  
3301 TTTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATGAGTAA ACTTGGTCTG ACAGTTACCA  
3351 ATGCTTAATC AGTGAGGCAC CTATCTCAGC GATCTGTCTA TTTCGTTTAT  
3401 CCATAGTTGC CTGACTCCCC GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGGC  
3451 TTACCATCTG GCCCCAGTGC TGCAATGATA CCGCGAGACC CACGCTCACC  
3501 GGCTCCAGAT TTATCAGCAA TAAACCAGCC AGCCGGAAGG GCCGAGCGCA  
3551 GAAGTGGTCC TGCAACTTTA TCCGCCTCCA TCCAGTCTAT TAATTGTTGC  
3601 CGGGAAGCTA GAGTAAGTAG TTCGCCAGTT AATAGTTTGC GCAACGTTGT  
3651 TGCCATTGCT ACAGGCATCG TGGTGTACAG CTCGTCGTTT GGTATGGCTT  
3701 CATTAGCTC CGGTTCCCAA CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCCATG  
3751 TTGTGCAAAA AAGCGGTTAG CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTACAGAA  
3801 TAAGTTGGCC GCAGTGTAT CACTCATGGT TATGGCAGCA CTGCATAATT  
3851 CTCTTACTGT CATGCCATCC GTAAGATGCT TTTCTGTGAC TGGTGAGTAC  
3901 TCAACCAAGT CATTCTGAGA ATAGTGTATG CCGCGACCGA GTTGCTCTTG  
3951 CCCGGCGTCA ATACGGGATA ATACCGCGCC ACATAGCAGA ACTTTAAAAG  
4001 TGCTCATCAT TGGAAAACGT TCTTCGGGGC GAAACTCTC AAGGATCTTA  
4051 CCGCTGTTGA GATCCAGTTC GATGTAACCC ACTCGTGAC CCAACTGATC  
4101 TTCAGCATCT TTTACTTTCA CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA AAAACAGGAA  
4151 GGCAAAATGCCGCAAAAAAG GGAATAAGGGCGACACGGAA ATGTTGAATA  
4201 CTCATACTCT TCCTTTTTCA ATATTATTGA AGCATTATC AGGGTTATTG  
4251 TCTCATGAGC GGATAACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAAT AAACAAATAG  
4301 GGGTTCCGCG CACATTTCCC CGAAAAGTGC CACCTGACGT C

FIG. 8

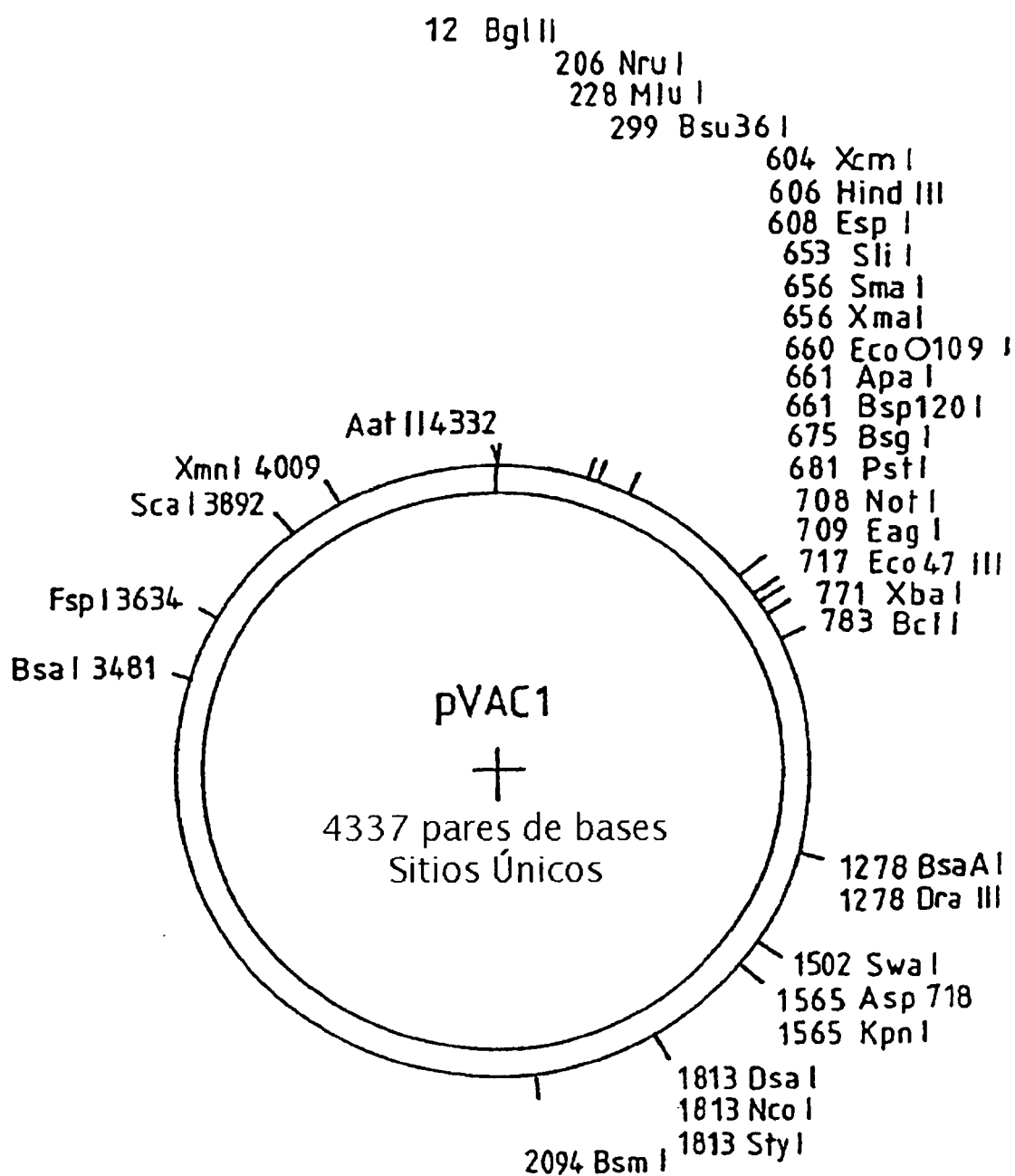


FIG. 9

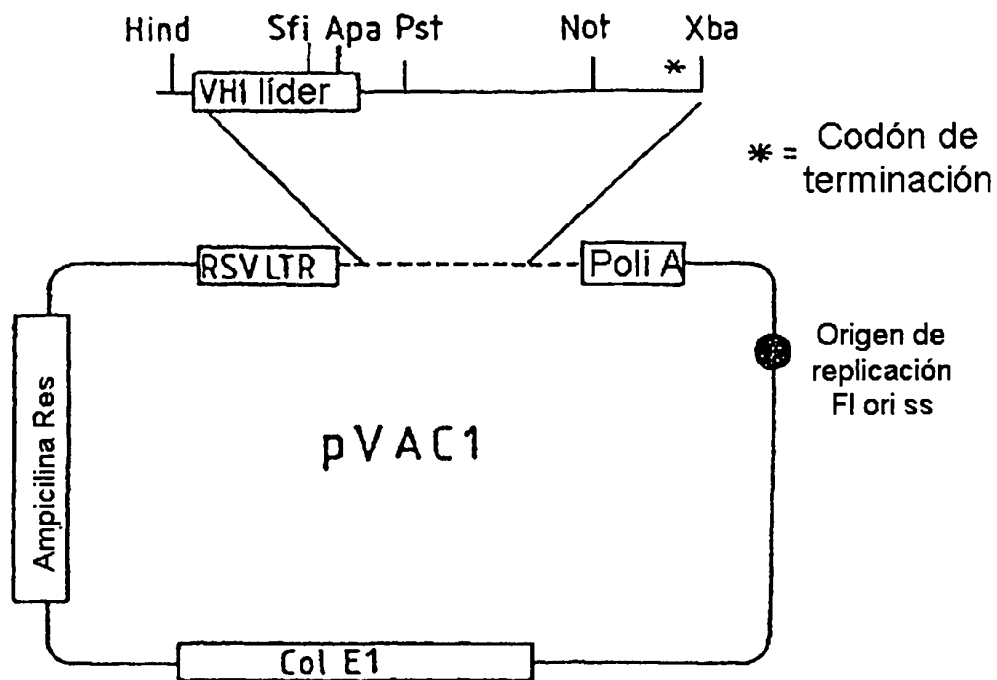
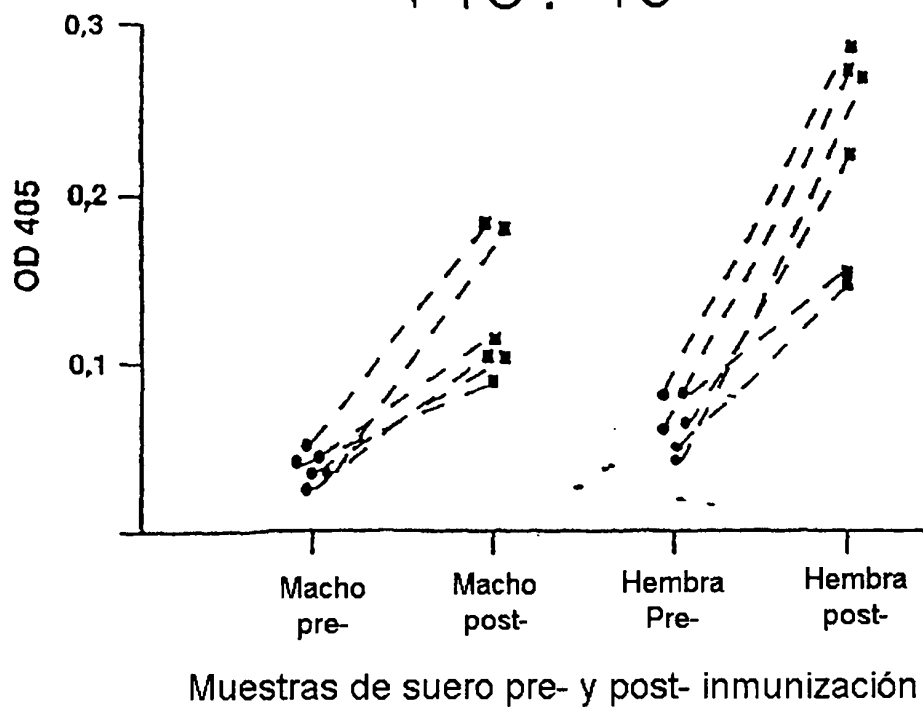
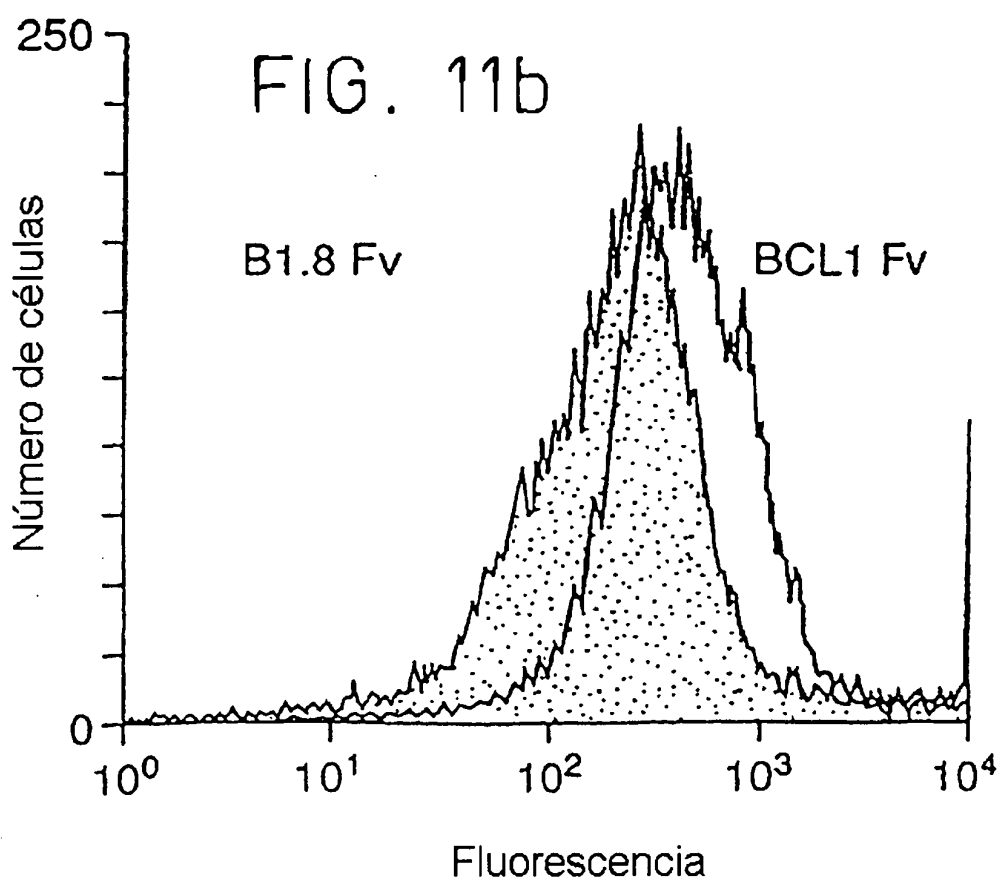
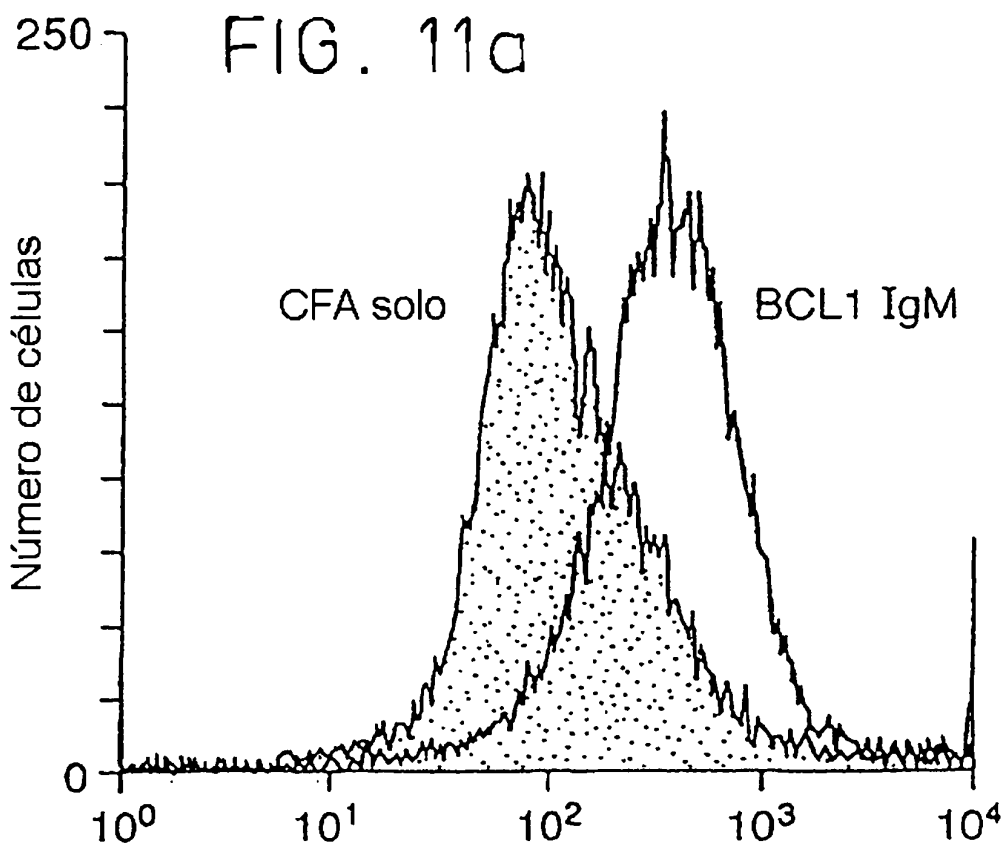


FIG. 10

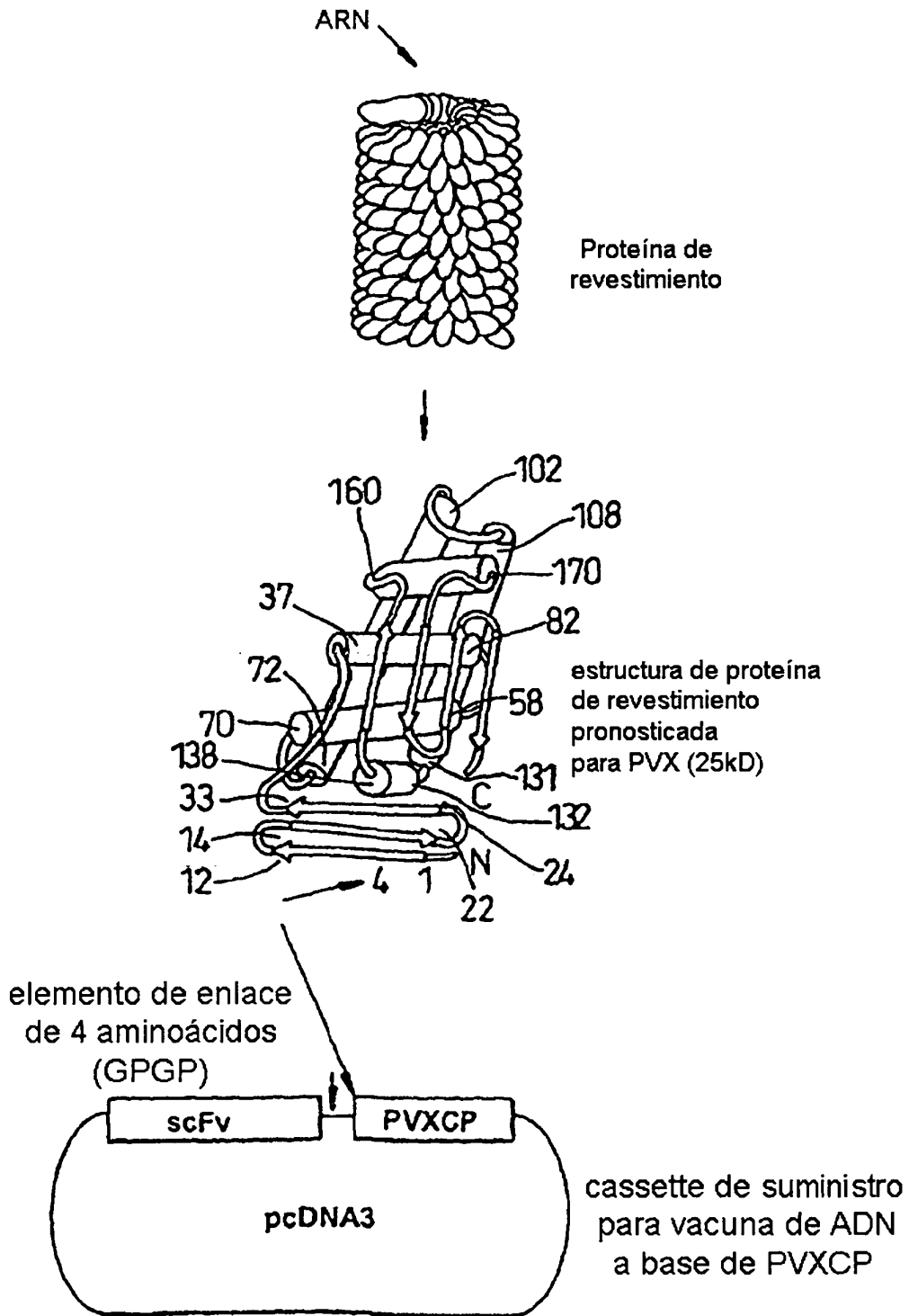




# FIG. 12

## Ensamblaje de fusiones scFv-PVXCP

Partícula del virus X de la patata



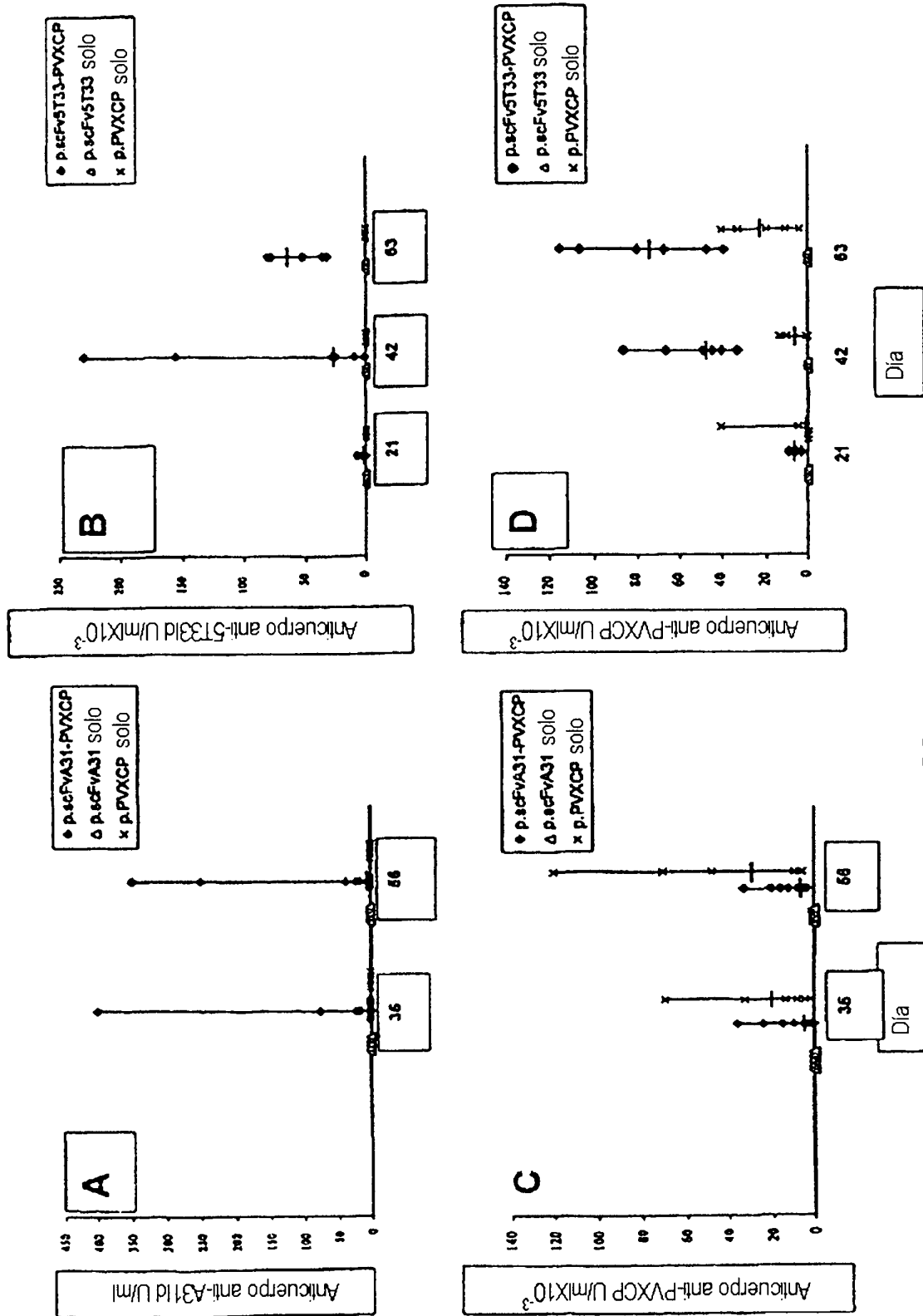
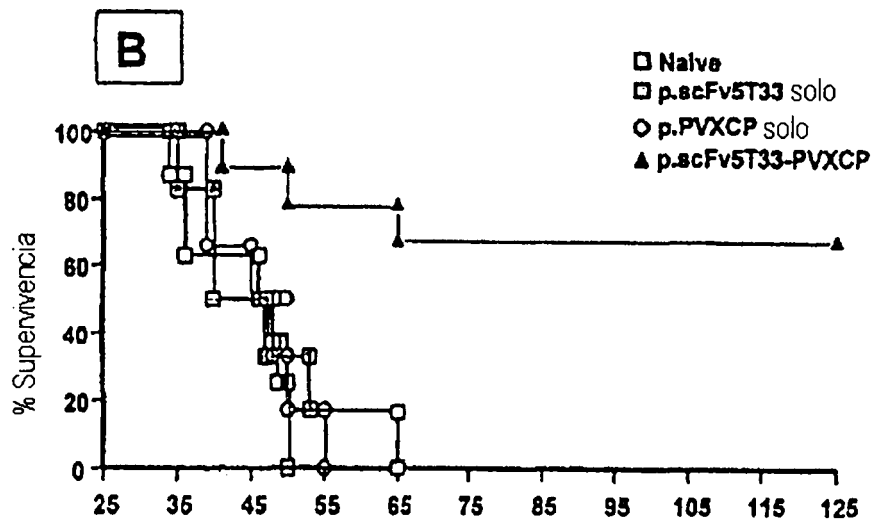
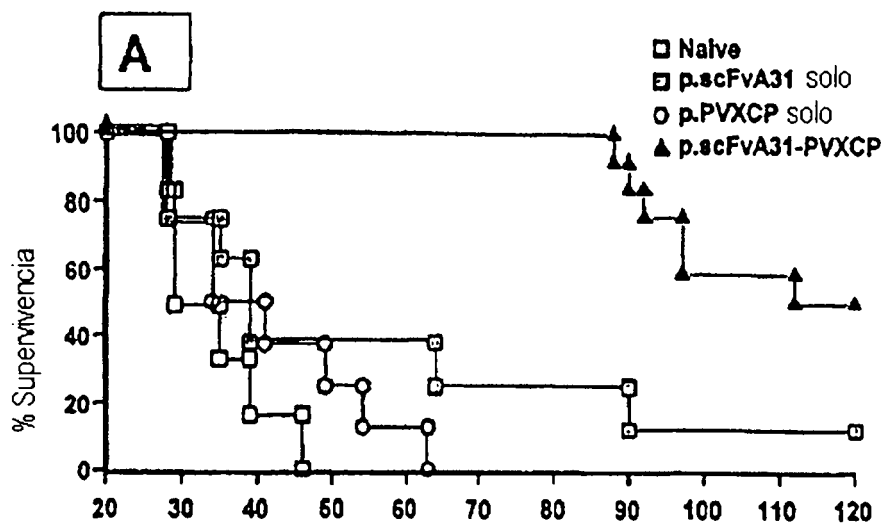


FIG. 13

FIG. 14



Días tras agresión tumoral

FIG. 15

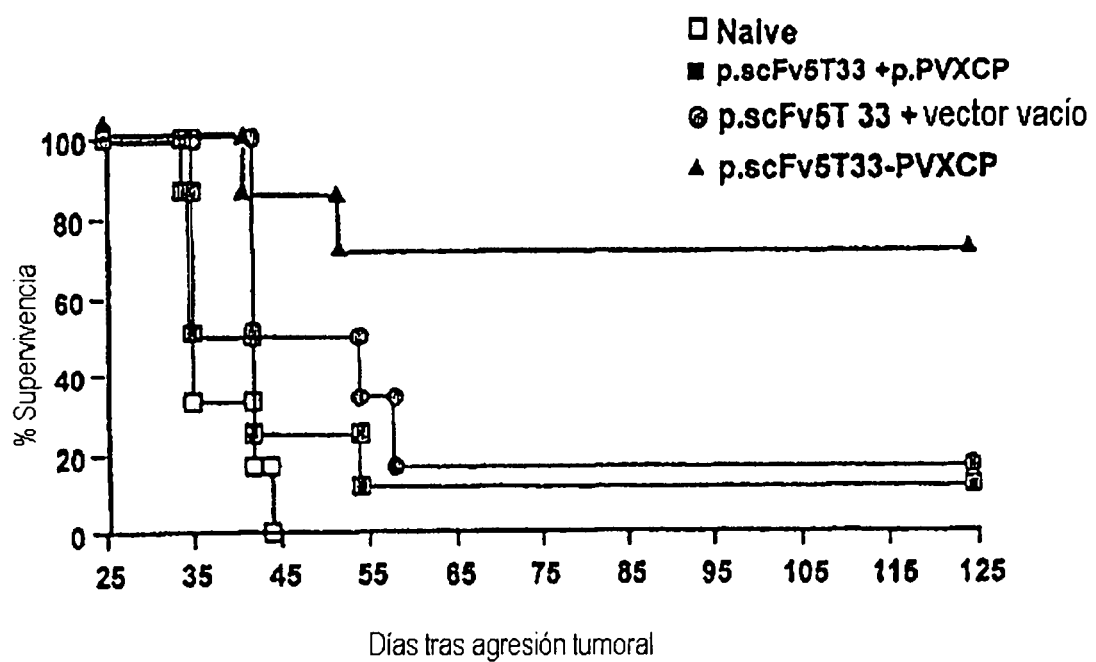


FIG. 16

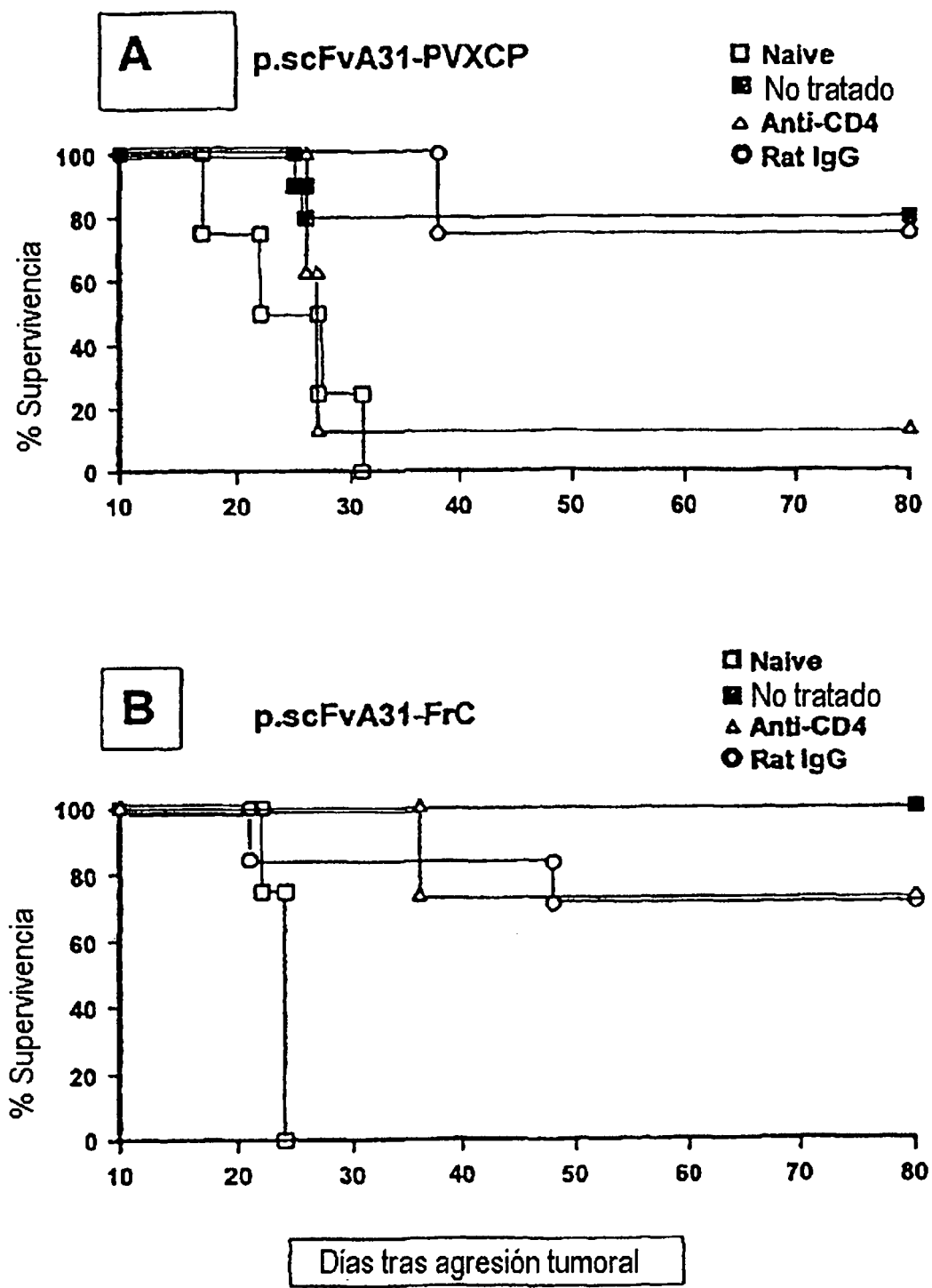
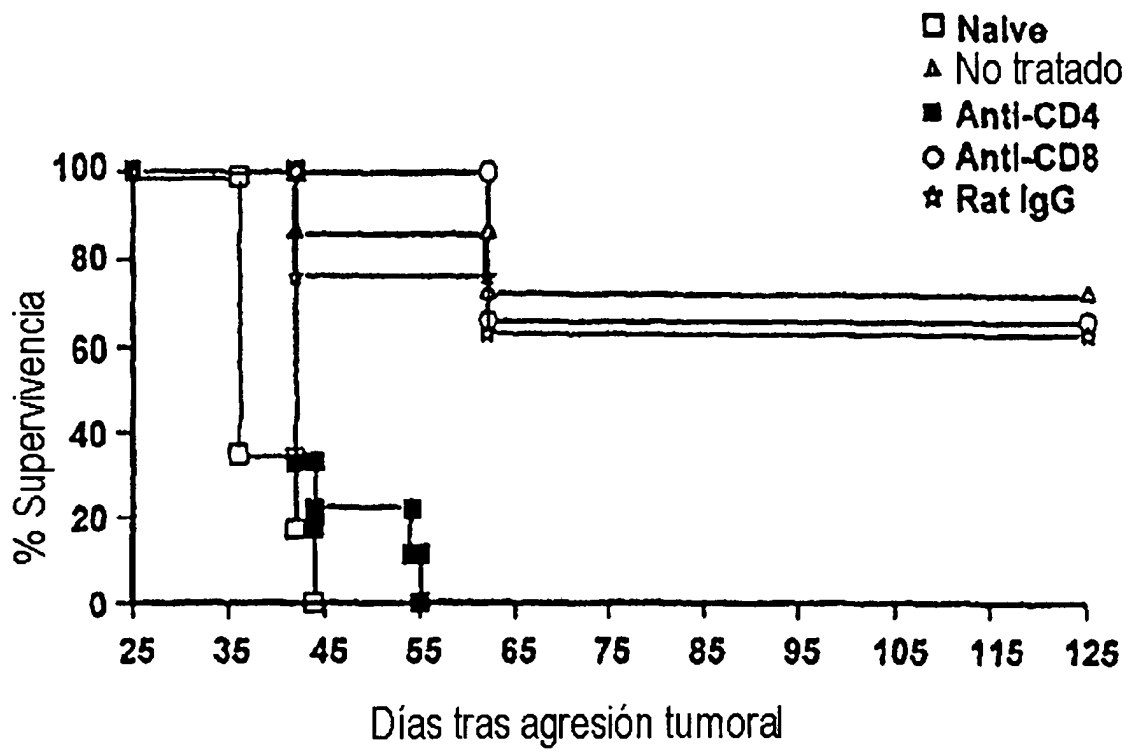
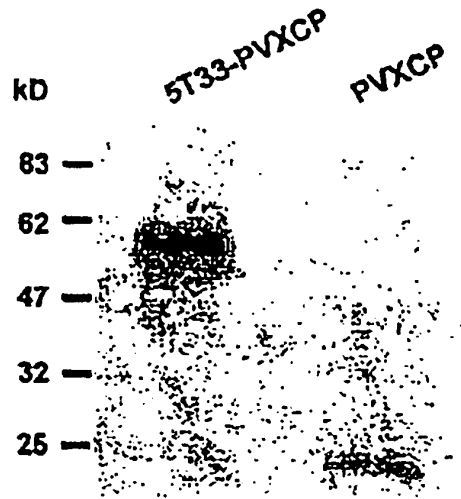


FIG. 17

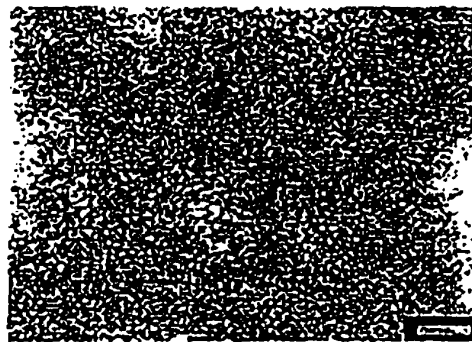


# FIG. 18

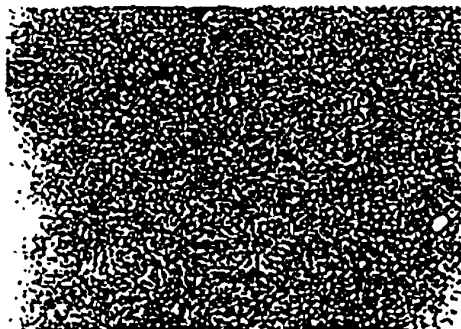
**A**



**B**



**5T33-PVXCP**



**PVXCP**

FIG. 19

